

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
4 janvier 2001 (04.01.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/00833 A1

(51) Classification internationale des brevets²: C12N 15/29, 15/82, A01H 5/00

(74) Mandataire: CATHERINE, Alain; Cabinet Harlé & Phélip, 7, rue de Madrid, F-75008 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/01768

(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international: 23 juin 2000 (23.06.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/08185 25 juin 1999 (25.06.1999) FR

(84) États désignés (*regional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*):
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA) [FR/FR]; 147, rue de l'Uni-
versité, F-75341 Paris Cedex 07 (FR).

Publiée:

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): HOFF-
MANN, Beate [DE/FR]; 31, avenue d'Aigrefoin, F-78114
Magny les Hameaux (FR). MOLIER, Pascale [FR/FR];
1, rue de la Gruerie, F-91190 Gif sur Yvette (FR). PEL-
LETIER, Georges [FR/FR]; 28, avenue de L'Espérance,
F-91440 Bures sur Yvette (FR).

(54) Title: PROMOTER EXPRESSED SPECIFICALLY IN THE CELLS OF PLANT ROOTS, RECOMBINANT VECTORS AND HOST CELLS COMPRISING SAME AND TRANSGENIC PLANTS OBTAINED

A1

(54) Titre: PROMOTEUR S'EXPRIMANT SPECIFIQUEMENT DANS LES CELLULES DE RACINES DE PLANTES, VECTEURS ET CELLULES HOTES RECOMBINANTES COMPRENANT UN TEL PROMOTEUR ET PLANTES TRANSGENIQUES OBTENUES

(57) Abstract: The invention concerns a novel plant promoter capable of directing the expression of a nucleotide sequence of interest in the cells of a plant root, and recombinant vectors containing such a promoter, preferably associated with a nucleotide sequence whereof the expression is desired in constitutive cells of plant roots.

WO 01/00833 A1

(57) Abrégé: La présente invention concerne un nouveau promoteur végétal capable de diriger l'expression d'une séquence nucléotidique d'intérêt dans les cellules de la racine d'une plante, ainsi que des vecteurs recombinants contenant un tel promoteur, de préférence associé à une séquence nucléotidique dont l'expression est recherchée dans les cellules constitutives des racines de plantes.

**Promoteur s'exprimant spécifiquement
dans les cellules de racines de plantes, vecteurs
et cellules hôtes recombinantes comprenant un tel
promoteur et plantes transgéniques obtenues**

5

La présente invention concerne un nouveau promoteur végétal capable de diriger l'expression d'une séquence nucléotidique d'intérêt dans les cellules de la racine d'une plante, ainsi que des vecteurs recombinants contenant un tel promoteur, de préférence associée à une séquence nucléotidique dont l'expression est recherchée dans les cellules constitutives des racines de plantes.

10 Dans les années récentes, les applications industrielles rendues possibles par les transformations des plantes à l'aide du génie génétique ont été croissantes.

15 De nombreux gènes d'origine procaryote ou eucaryote (d'animaux ou de plantes), codant spécifiquement pour des protéines conférant de nouvelles propriétés agronomiques, ont été isolés et transférés chez les plantes par génie génétique.

20 Dans un grand nombre de cas, les gènes qui ont été introduits dans des plantes constituent des séquences chimères, associant des éléments régulateurs d'origines différentes.

Ainsi, le gène codant pour une protéine d'intérêt est souvent placé sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort permettant à ladite protéine d'être exprimée dans la totalité de la plante.

25 A titre d'exemple, le promoteur du transcrit 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (35S CaMV) a été largement utilisé dans des constructions de gènes chimères pour l'expression de protéines d'intérêt chez les plantes.

30 Désormais, pour un grand nombre d'applications, il n'est pas nécessaire que la protéine d'intérêt conférant la propriété agronomique recherchée présente une expression distribuée dans la totalité des organes et/ou des types cellulaires de la plante transformée.

Très précocement, la recherche d'une expression plus spécifique du gène d'intérêt a été entreprise et a conduit, par exemple, à 35 l'identification de promoteurs spécifiques de tissus ou d'organes.

En particulier, un promoteur dirigeant l'expression d'un polynucléotide d'intérêt de façon à la fois forte et ciblée dans la racine permettrait de nombreuses applications que l'on peut classer comme suit :

- 5 (i) défense contre les pathogènes à point d'entrée racinaire, telles que des bactéries, des champignons, des nématodes ou des insectes.
- (ii) résistance au stress (froid, stress hydrique, stress salin);
- 10 (iii) amélioration de la qualité (exemple: augmenter la teneur en saccharose dans la betterave à sucre);
- (iv) nutrition (exemple: exprimer un gène de transporteur des nitrates).

Comme déjà indiqué plus haut, les promoteurs décrits dans l'état de la technique ne permettent pas l'expression d'un polynucléotide d'intérêt dans l'ensemble des couches cellulaires de la racine y compris toutes les assises.

Par exemple, le gène *arsk1* d'*A. thaliana* (Hwang *et al.*, 1995) est exprimé spécifiquement dans la racine, mais son expression est limitée aux couches externes de la racine (épiderme, endoderme, cortex) 20 c'est-à-dire les cellules impliquées dans l'absorption d'eau. L'expression est très faible dans le système vasculaire. Le profil d'expression de ce gène évoque un rôle dans le stress hydrique. De fait, l'expression de ce gène est inducible par un stress hydrique (exposition des racines à l'air, ou traitement des racines par l'ABA ou NaCl), et diminue fortement 25 lorsque les racines sont réhydratées.

Un autre exemple illustratif est le mutant *scarecrow* d'*A. thaliana* (Malamy *et al.* 1997) qui est affecté dans l'organisation radiale de la racine: les couches de l'endoderme et du cortex ne s'individualisent pas et restent fusionnées en une couche mutante possédant des 30 caractéristiques de l'endoderme et du cortex. Le gène *scarecrow* affecté par la mutation est exprimé dans l'endoderme, les cellules initiales de l'endoderme, et parfois dans le centre quiescent de la racine.

De plus, les promoteurs décrits dans l'état de la technique, d'une part, ne permettent pas un haut niveau d'expression du

polynucléotide d'intérêt, et d'autre part, ne sont pas actifs tout au long du développement de la plante.

Le besoin d'un promoteur végétal fort, spécifique des racines, et actif quel que soit le stade de développement de la plante, est 5 désormais comblé selon la présente invention.

La demanderesse a ainsi isolé, à partir du génome végétal *d'Arabidopsis thaliana*, un nouveau promoteur capable de diriger l'expression d'un polynucléotide d'intérêt spécifiquement dans les 10 racines d'une plante, ledit promoteur assurant un haut niveau d'expression du polynucléotide d'intérêt à la fois dans l'épiderme, le cortex, le vaisseau ou l'endoderme ainsi que dans toutes les assises de la racine, ceci durant tous les stades de développement de la plante.

Ainsi, la présente invention est relative à un acide nucléique isolé caractérisé en ce qu'il comprend un polynucléotide codant pour un 15 promoteur végétal capable de diriger l'expression d'une séquence nucléotidique d'intérêt dans les cellules de la racine d'une plante, durant la totalité du développement de cette dernière, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

De préférence, un acide nucléique selon l'invention se présente 20 sous une forme isolée ou purifiée.

Le terme « isolé » au sens de la présente invention désigne un matériel biologique qui a été soustrait à son environnement originel (l'environnement dans lequel il est localisé naturellement). Par exemple, un polynucléotide présent à l'état naturel dans une plante ou un animal 25 n'est pas isolé. Le même polynucléotide séparé des acides nucléiques adjacents au sein desquels il est naturellement inséré dans le génome de la plante ou l'animal est isolé.

Un tel polynucléotide peut être inclus dans un vecteur et/ou un tel polynucléotide peut être inclus dans une composition et demeurer néanmoins à l'état isolé du fait que le vecteur ou la composition ne 30 constitue pas son environnement naturel.

Le terme « purifié » ne nécessite pas que le matériel soit présent sous une forme de pureté absolue, exclusive de la présence d'autres composés. Il s'agit plutôt d'une définition relative.

Un polynucléotide est à l'état purifié après purification du matériel de départ ou du matériel naturel d'au moins un ordre de grandeur, de préférence 2 ou 3 et préférentiellement 4 ou 5 ordres de grandeur.

Aux fins de la présente description, l'expression « séquence nucléotidique » peut être employée pour désigner indifféremment un polynucléotide ou un acide nucléique. L'expression « séquence nucléotidique » englobe le matériel génétique lui-même et n'est donc pas restreinte à l'information concernant sa séquence.

L'invention concerne également un acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'un polynucléotide possédant au moins 80% d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°1, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

Le « pourcentage d'identité de nucléotides » entre deux séquences, au sens de la présente invention, peut être déterminé en comparant deux séquences alignées de manière optimale, à travers une fenêtre de comparaison. La partie de la séquence nucléotidique dans la fenêtre de comparaison peut ainsi comprendre des additions ou des délétions (par exemple des « gaps») par rapport à la séquence de référence (qui ne comprend pas ces additions ou ces délétions) de manière à obtenir un alignement optimal des deux séquences.

Le pourcentage est calculé en déterminant le nombre de positions auxquelles une base nucléique identique est observée pour les deux séquences comparées, puis en divisant le nombre de positions auxquelles il y a identité des deux bases par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison, puis en multipliant le résultat par 100 afin d'obtenir le pourcentage d'identité de séquence.

L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé de manière informatique à l'aide d'algorithmes connus (par exemple le logiciel FASTA de la Société WISCONSIN GENETICS SOFTWARE PACKAGE, GENETICS COMPUTER GROUP (GCG), 575 Science Doctor, Madison , Wis).

A titre d'illustration, le pourcentage d'identité de séquence pourra être effectué à l'aide du logiciel précité FASTA, en utilisant exclusivement les paramètres par défaut.

Ainsi, les différences nucléotidiques que peut comprendre un acide nucléique selon l'invention par rapport à la séquence nucléotidique SEQ ID N°1 peut résulter en des substitutions, délétions ou additions d'un ou plusieurs nucléotides consécutifs ou non.

5 Font également partie de l'invention des acides nucléiques comprenant tout ou partie d'un polynucléotide possédant au moins 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5%, ou encore 99,8% d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°1, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

10 Selon un autre aspect, l'invention est également relative à un acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'un polynucléotide hybride, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°1, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

15 Par « partie » d'un polynucléotide promoteur selon l'invention, on entendra une séquence nucléotidique d'une longueur en bases inférieure à celle de la séquence SEQ ID N°1 et conservant la capacité à diriger l'expression d'une séquence nucléotidique d'intérêt dans les cellules de la racine d'une plante.

20 L'activité biologique d'une partie d'un polynucléotide promoteur selon l'invention peut être aisément vérifiée par l'homme du métier, notamment à l'aide des constructions de vecteurs et des procédés de transformation de plantes avec ces derniers, tels que décrits dans les exemples.

25 Par « partie » d'un promoteur selon l'invention, on entend notamment les séquences candidates suivantes:

- le polynucléotide allant du nucléotide en position 1 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3;
- le polynucléotide allant du nucléotide en position 493 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3;
- le polynucléotide allant du nucléotide en position 1076 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3;
- le polynucléotide allant du nucléotide en position 1976 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3; et

- le polynucléotide allant du nucléotide en position 2040 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3.

A titre illustratif, une partie d'un polynucléotide promoteur selon l'invention peut être obtenue par coupure enzymatique d'un acide nucléique tel que décrit ci-dessus, notamment un acide nucléique de séquence SEQ ID N°1, à l'aide d'endonucléases de restriction.

Une « partie » d'un polynucléotide promoteur selon l'invention peut être aussi obtenue par exemple par délétion d'un ou plusieurs nucléotides du polynucléotide de séquence SEQ ID N°1 à l'aide de la technique à l'exonucléase III décrite dans les exemples. Un polynucléotide partie du promoteur végétal selon l'invention a avantageusement une longueur en nucléotides allant de 200, 250, 300, 400, 500, 750, 100, 1200, 1500 ou 2000 nucléotides (ou paire de bases s'il se présente sous la forme double brin).

L'homme du métier peut à cet effet utiliser la carte de restriction de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1, représentée à la figure 1.

Pour la mise en œuvre d'enzymes de restriction aux fins d'obtenir des fragments de polynucléotides correspondant à une partie d'un polynucléotide promoteur selon l'invention, l'homme du métier pourra avantageusement se référer à l'ouvrage de Sambrook *et al.* (1989, Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York).

Une partie d'un polynucléotide promoteur selon l'invention pourra également être préparée par amplification spécifique du fragment d'intérêt à l'aide d'un couple d'amorces encadrant, respectivement du côté 5' et du côté 3', la séquence d'intérêt, par exemple à l'aide de la méthode PCR, telle que décrite notamment dans les brevets américains N°US 4 683 195, US 4,683,202 et US 4,965,188.

Par « conditions d'hybridation de forte stringence » au sens de la présente invention, on entendra les conditions d'hybridation suivantes:

• préhybridation des filtres pendant 8 heures à 65°C dans un tampon composé de 6 x SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0,02% PVP, 0,02% Ficoll, 0,02% BSA, et 500 µg par ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé;

- hybridation des filtres pendant 48 heures à 65°C en présence de tampon 1 x SSC correspondant à 0,15 M de NaCl et 0,05M de citrate de sodium;

5

- trois lavages des filtres dans une solution contenant 2 x SSC et 0,1% SDS à 68°C pendant 15 minutes.

Les conditions d'hybridation décrites plus haut sont adaptées à l'hybridation, dans des conditions de forte stringence, d'une molécule d'acide nucléique d'une longueur de 20 nucléotides.

Il va sans dire que les conditions d'hybridation ci-dessus décrites doivent être adaptées en fonction de la longueur de l'acide nucléique dont l'hybridation est recherchée, selon des techniques bien connues de l'homme du métier.

Les conditions convenables d'hybridation peuvent par exemple être adaptées selon l'enseignement contenu dans l'ouvrage de Hames et Higgins (1985, Nucleic Acid Hybridization : A practical approach , Hames and Higgins Ed., IRL Press, Oxford), ou encore dans l'ouvrage de Sambrook *et al.* (1989) précité.

L'invention concerne également un acide nucléique comprenant un polynucléotide promoteur tel que défini ci-avant, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une séquence nucléotidique d'intérêt fonctionnellement associée au promoteur végétal et dont l'expression est recherchée dans les cellules de la racine d'une plante.

Un acide nucléique répondant à une telle définition est par exemple l'acide nucléique de séquence nucléotidique SEQ ID N°2 comprenant la séquence du gène *gus* placé sous le contrôle du promoteur de séquence nucléotidique SEQ ID N°1.

De manière avantageuse, un tel acide nucléique comprendra une séquence nucléotidique d'intérêt choisie parmi les séquences codantes de gène interagissant avec des parasites ou des pathogènes tels que les nématodes ou les champignons, comme par exemple les séquences codantes de glucanase, ladite séquence nucléotidique

d'intérêt étant placée sous le contrôle d'un polynucléotide promoteur selon l'invention.

Il peut également s'agir de séquences d'endochitinases telles que celles décrites dans le brevet européen n° EP 493,581 ou encore de séquences de gènes agissant sur la teneur en sucre de la plante.

A titre d'exemple, les séquences codantes de gènes d'intérêt assurant la protection d'une plante contre d'autres conditions de stress pourront être avantageusement placées sous le contrôle d'un polynucléotide promoteur selon l'invention.

10 Stress hydrique ou salin:

- gène arsk1 (Hwang, I. et al. ; 1995);
- CDNA pA9 (Winicov, I. , Deutch S.E. 1994);
- CDNA Alfin 1 (Bastola, DR et al. 1998).

15 D'autres séquences codantes pourraient être utilisées sous le contrôle du promoteur selon l'invention, pour agir sur la teneur en saccharose de la betterave à sucre: gène BvSPS1 (Hesse H. et al., 1995), ou surexprimer un gène déjà exprimé physiologiquement comme les gènes de transporteurs de nitrate NRT₁ ou NRT₂ (Crawford, N.M. et al. ,1998; Leah R. et al., 1991).

20 L'invention est en outre relative à des fragments nucléotidiques comprenant 10 à 2000 nucléotides consécutifs d'un acide nucléique selon l'invention, en particulier d'un acide nucléique possédant au moins 80% d'identité en nucléotide avec la séquence SEQ ID N°1 ou encore un acide nucléique hybride, dans des conditions d'hybridation de forte 25 stringence, avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°1, ou d'un acide nucléique de séquence complémentaire.

30 De préférence, de tels fragments auront une longueur de 10, 12, 15, 18 ou 20 à 25, 35, 40, 50, 70, 80, 100, 200, 500, 1000, 1500 ou 2000 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide promoteur selon l'invention ou consistant en des fragments d'une longueur de 12, 15, 18, 20, 25, 35, 40, 50, 70, 80, 100, 200, 500, 1000, 1500 ou 2000 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide promoteur selon l'invention.

35 De tels fragments nucléotidiques pourront avantageusement être mis en œuvre en tant que sondes ou amorces nucléotidiques aux fins de détection ou d'amplification de la totalité ou d'une partie d'une

séquence à activité promoteur spécifique des racines de plantes selon l'invention.

Selon encore un autre aspect, l'invention concerne un vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression comprenant un 5 polynucléotide promoteur selon l'invention. Un tel vecteur recombinant comprendra avantageusement une séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle dudit promoteur végétal.

Des vecteurs pouvant être utilisés aux fins de la présente invention sont notamment les suivants:

10

- vecteur pBIN19 (Bevan *et al.*, 1984, Nucleic Acids Research, vol. 12: 8711-8721, commercialisé par la Société CLONTECH , Palo Alto, Californie, USA);

15

- vecteur 101 (Jefferson , 1987, Plant Molecular Biology Reporter, vol.5: 387-405, commercialisé par la Société CLONTECH);

- vecteur pBI221 (Jefferson, 1987, Plant Molecular Biology Reporter, vol.5: 387-405, commercialisé par la Société CLONTECH);

20

- vecteur pBI121 (Jefferson, 1987, Plant Molecular Biology Reporter, vol.5: 387-405, commercialisé par la Société CLONTECH).

- vecteur pEGFP (Cormack, B.P. *et al.* 1996; Yang T.T. *et al.*, 1996), commercialisé par la Société Clontech.

25

- vecteur pC-gus représenté à la figure 10.

Un vecteur recombinant préféré selon l'invention est par exemple le vecteur recombinant contenu dans la souche d'*E. Coli* déposée à la Collection Nationale de Culture de Micro-Organismes (CNCM) le 25 Mai 1999 sous le n° d'accès I-2218.

L'invention a en outre pour objet une cellule hôte recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend un acide nucléique à activité de promoteur végétal spécifique des racines de plantes selon l'invention, éventuellement associée à un polynucléotide d'intérêt placé sous le

contrôle de ce dernier, ou un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus.

Les cellules hôtes recombinantes préférées selon l'invention peuvent être indifféremment d'origine bactérienne ou végétale.

5 Ainsi, peuvent notamment être utilisées des cellules bactériennes de différentes souches de *E. coli* ou encore d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Il s'agit également de cellules de plantes transformées par un vecteur conforme à l'invention, tel que des cellules d'*Arabidopsis thaliana*, de colza, de tabac ou encore de maïs.

10 Une cellule hôte recombinante préférée selon l'invention est la cellule de la souche de *E.coli* déposée à la CNCM le 25 Mai 1999 sous le n°d'accès I-2218.

15 L'invention concerne aussi un organisme multicellulaire végétal recombinant caractérisé en ce qu'il comprend des cellules hôtes recombinantes telles que définies ci-dessus.

20 L'invention concerne en particulier une plante transgénique comprenant, sous une forme intégrée dans son génome, un acide nucléique selon l'invention, en particulier un acide nucléique comprenant un polynucléotide promoteur conforme à l'invention et une séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle de ce dernier.

Une plante transgénique selon l'invention peut être notamment un colza, un tabac, un maïs ou encore *Arabidopsis thaliana*.

25 Les plantes transgéniques telles que définies ci-dessus ont donc la propriété d'exprimer une séquence nucléotidique d'intérêt spécifiquement au niveau des différents types cellulaires de la racine (de l'extérieur vers l'intérieur: épiderme, cortex, endoderme, pericycle, vaisseau), à tous les stades de développement de la plante.

30 L'invention a en outre pour objet un procédé d'obtention d'une plante transgénique exprimant spécifiquement une séquence nucléotidique d'intérêt dans les cellules de la racine à tous les stades de développement de ladite plante, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

35 a) obtention d'une cellule hôte recombinante végétale conforme à l'invention;

b) régénération d'une plante entière à partir de la cellule hôte recombinante obtenue à l'étape a);

c) sélection des plantes obtenues à l'étape b) ayant intégré la séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle du 5 polynucléotide promoteur végétal selon l'invention.

L'invention est également relative à un procédé d'obtention d'une plante transgénique caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

10 a) obtention d'une cellule hôte recombinante d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant une séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle du polynucléotide promoteur végétal selon l'invention;

15 b) transformation de la plante d'intérêt par infection avec la cellule hôte recombinante d'*Agrobacterium tumefaciens* obtenue à l'étape a);

c) sélection des plantes ayant intégré la séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle du polynucléotide promoteur végétal selon l'invention.

20 L'invention a en outre pour objet un procédé d'obtention d'une plante transgénique caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes:

25 a) transfection d'une cellule de plante avec un acide nucléique ou un vecteur recombinant comprenant une séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle du polynucléotide promoteur selon l'invention;

b) régénération d'une plante entière à partir de cellules de plante recombinantes obtenues à l'étape a) ;

30 c) sélection des plantes ayant intégré la séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle du polynucléotide promoteur végétal selon l'invention.

35 L'un quelconque des procédés d'obtention d'une plante transgénique ci-dessus décrit peut en outre comporter les étapes additionnelles suivantes:

- d) croisement entre elles de deux plantes transgéniques telles qu'obtenues à l'étape c);
 - e) sélection des plantes homozygotes pour le transgène.

5 Selon une autre alternative, l'un quelconque des procédés ci-dessus décrits pourra en outre comprendre les étapes suivantes:

- d) croisement d'une plante transgénique obtenue à l'étape c) de l'un quelconque de ces procédés avec une plante de la même espèce;
- 10 e) sélection des plantes issues du croisement de l'étape d) ayant conservé le transgène.

L'invention a en outre pour objet une plante transgénique telle qu'obtenue selon l'un quelconque des procédés ci-dessus.

15 De manière préférée, une plante transgénique selon l'invention a non seulement intégré dans son génome un transgène comprenant une séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle du polynucléotide promoteur végétal présentement décrit mais exprime ladite séquence nucléotidique d'intérêt majoritairement ou exclusivement 20 dans les cellules constitutives de la racine.

Enfin, l'invention concerne aussi une semence de plante dont les cellules constitutives comprennent dans leur génome un acide nucléique selon l'invention.

Il s'agit notamment d'une semence de *Arabidopsis thaliana*, de 25 colza, de tabac ou de maïs ayant incorporé un acide nucléique selon l'invention.

L'invention sera en outre illustrée, sans pour autant être limitée, par les figures et les exemples suivants.

30 La figure 1 représente une carte de restriction de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1.

Les motifs suivants ont été identifiés dans cette séquence: deux 35 motifs TGACG correspondant au site de fixation du facteur Asfl spécifique de la racine dans le promoteur 35 S du CaMV (position 1000-1004 et 1866-1870), deux motifs proches, à un nucléotide près, de

séquences enhancer du même promoteur 35S (position 28-35: CTGAAAG, au lieu de GTGAAAG et position 882-889: GTGCTTTG, au lieu de GTGGTTTG) et 3G-box ACGT (positions 285-288, 604-607, 1107-1110). Par ailleurs, cette séquence comporte 21 motifs TATA et 9 motifs CAAT.

L'importance fonctionnelle de ces motifs pourra être évaluée par la méthode à l'exonucléase III, selon Ausubel *et al.* (1989). Cette méthode permet d'obtenir des fragments de promoteur de taille décroissante, qui seront clonés en amont du gène *gus* dans un vecteur permettant la transformation d'*Arabidopsis*.

La figure 2 illustre la construction 1 ayant été utilisée pour l'isolement du promoteur selon l'invention, en l'absence (figure 2a) ou en présence (fig.2b) de l'insert.

L'insert de 4.27 kb est cloné à partir du vecteur de « kanamycin rescue » (figure 7) dans l'ADN-T du vecteur pBin19 par une double digestion EcoRI-XbaI. Cet insert comporte 2.14 kb de séquence génomique du clone Ir1 (SEQ ID N°3 nct 136-2284) et 2.13kb de l'ADN-T de pGKB5: séquence codante de *gus* et signal de polyadénylation nos (figure 8 - nct 632-2762).

LB : bordure gauche de l'ADN-T de pBin19.

LacZ: lacZ région du phage M13mp19.

NPTII: fragment contenant le promoteur nos, le gène de résistance à la néomycine, et le site de polyadénylation nos.

RB : bordure droite de l'ADN-T de pBin19.

kan: fragment contenant l'origine de réPLICATION RK2 du plasmide pRK252 et le gène kan de résistance à la kanamycine de *Streptococcus*.

La figure 3 illustre l'expression GUS du transformant d'*Arabidopsis* (écotype WS) au cours du développement.

a- 7 jours après germination.

b- 14 jours après germination.

c- 24 jours après germination.

d- détail d'une racine.

La figure 4 illustre une coupe transversale de racine du transformant après révélation de l'activité GUS.

La figure 5 représente une autoradiographie d'un Northern blot 5 hybridé avec une sonde GUS.

6 µg d'ARN ont été déposés dans chaque puits.

Puits n°1-3-5: ARN de parties aériennes du transformant homozygote n°1, n°13 et de plante non transformée WS, respectivement.

10 Puits n°2-4-6: ARN de racines des mêmes plantes.

La figure 6 illustre l'analyse quantitative de l'expression GUS de transformants d'*Arabidopsis* obtenus avec la construction 1, au cours du développement. Elle matérialise la comparaison de l'activité GUS dans 15 les racines et la partie aérienne du transformant initial (a) et des transformants individuels caractéristiques 6-1 et 2b (b-c), au cours du développement.

20 L'activité gus est exprimée en unités de fluorescence par minute et par :

- 1 µg de protéines (racines)
- 20 µg de protéines (feuilles)

A 2,72 unités de fluorescence correspond 1 pmol du produit 25 mu, qui est le produit de la catalyse enzymatique du substrat mug (4-méthyl-β-D glucuronide) par GUS.

La figure 7 illustre le vecteur obtenu à la suite du « Kanamycin 30 rescue ». La technique de « kanamycine rescue » utilise le vecteur P38 (a), qui comporte le début du gène NptII de résistance à la kanamycine, jusqu'au site PstI, en aval d'un promoteur IS50. Après digestion par PstI du vecteur P38 et de l'ADN du transformant, ligation des deux et sélection sur kanamycine, on obtient le vecteur montré en b). L'insert 35 1 est le fragment PstI obtenu à partir de l'ADN génomique du transformant: il comporte la région promotrice (SEQ ID N°1, nct 1 à

2149) accolée au fragment d'ADN-T délimité par le site d'insertion côté RB et le site PstI situé dans le gène de la kanamycine (figure 8, nct 632 à 4279). Le gène de résistance à la kanamycine se trouve ainsi reconstitué et le vecteur recombinant est sélectionné sur kanamycine.

5

La figure 8 donne une représentation schématique de l'ADN-T de PGKB5 utilisé pour créer la collection de transformants de Versailles.

10 La figure 9 illustre la séquence de l'ADN-T de PGKB5, également référencée comme la séquence SEQ ID N°5.

- RB bordure de 24 pb: 574-596,

15 - gène *gus* : séquence *gus* sans promoteur : 638-2504 (ATG:638-640, codon stop: 2444-2446), site de polyadénylation du *gus*: 3'nos: 2505-2793, site EcoRI: AATT/C:2759-2763.

- gène *KanR* : promoteur nos: 4752-4480, séquence *KanaR*: 4479-3490 (ATG: 4466-4464, codon stop : 3665-3663, site PstI: CTGCA/G : 4275-4280), site *ocs*3': 3489-2794.

20 - gène *PhosphinotricineR* (*bastaR*): promoteur 35S: 4767-5890, séquence *phosphinotricineR*: 5890-6503 (ATG:5930-5932, codon stop: 6480-6482), site 3'g7: 6504-6789.

- LB bordure de 24 pb: 6962-6986.

25 La figure 10 représente une carte détaillée du vecteur pC-gus utilisé dans l'exemple 5.

EXEMPLES:

MATERIELS ET METHODES:

30

I - Transformation

(Bechtold N., Ellis J., Pelletier G. , 1993. *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C.R. Acad. Sci. Paris* **316**: 1194-1199.)

6 mg de graines (soit environ 300 graines) d'*Arabidopsis thaliana* d'écotype Wassilevskija ont été semés sur des bacs de compost 40 x 30 cm. Les bacs sont laissés 64 h à 4°C pour la germination, puis 5 sont placés en serre (photopériode : 16h de jour, température : 15° C nuit / 25°C minimum jour) et arrosés avec la solution nutritive standard de Coïc et Lessaint (Coïc, Y., Lessaint, C. 1971. Comment assurer une bonne nutrition en eau et ions minéraux en horticulture. *Hortic. fr.*8:11-14).

10 MP5-1 *Agrobacterium* est cultivé dans du milieu LB (Luria-Bertani, Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York) avec 50 mg/l de rifampicine, 100 mg/l de gentamycine et 200 mg/l de kanamycine, 14h à 28°C (jusqu'à A₆₀₀=0.8). Après centrifugation, le culot de bactéries est 15 remis en suspension dans le milieu d'infiltration (MI), à un tiers du volume de culture initial (MI= macro et micro nutriments de Murashige et Skoog, contenant 10 µg/l 6-benzylaminopurine et 5% sucre (Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 : 473-497). Des 20 lots de 100 à 500 plantes de 3 à 4 semaines bien développées ont été extraits du sol, rincés à l'eau, immergés dans 2l de milieu MI contenant *Agrobacterium* dans une cloche à vide de 10l de contenance. Les plantes sont maintenues sous vide (10^4 Pa) pendant 20 mn. Toutes les manipulations des plantes traitées, jusqu'à leur récolte, ont été 25 effectuées avec des gants en latex. Les plantes traitées ont été plantées dans un nouveau compost, à raison de 54 plantes par bac, puis incubées 2 jours sous un plastique pour prévenir toute déshydratation et pour faciliter l'enracinement. Quatre à six semaines après la plantation, la génération T1 a été récoltée en mélange. Les plants ont été 30 sélectionnés sur du sable irrigué avec de l'eau contenant de l'herbicide

Basta (5-10 mg/ml phosphinothricine). Deux mois plus tard, les graines T2 ont été récoltées individuellement et conservées pour les analyses ultérieures.

5 II – « Kanamycin rescue »

(Bouchez D., Vittorioso P., Courtial B., Camilleri C., 1996.
Kanamycin Rescue: A Simple technique for the recovery of T-DNA
flanking sequences. *Plant Mol. Biol. Rep.* **14**: 115-123.)

10

- Extraction de l'ADN génomique

De 0,5 à 0,75g de feuilles sont congelés rapidement dans l'azote liquide, broyés, en présence de polyclarTM, en fine poudre dans 15 un mortier à l'aide d'un pilon, et la poudre est transférée avec l'azote liquide dans un tube "Oak Ridge", dans lequel sont ajoutés 15ml de tampon d'extraction (Tris 100mM, EDTA 50mM, NaC 1500mM, β-mercaptopéthanol 10mM, pH8). Après addition de 1ml de SDS 20%, les tubes sont incubés à 65°C pendant 10mn en agitant toutes les 3 à 4mn. 20 5ml d'acétate de potassium (5M) sont ajoutés et incubés à 0°C pendant au moins 20mn. Après centrifugation à 25000g (13000rpm) pendant 20mn, le surnageant est filtré à travers un filtre Miracloth (Calbiochem) dans un tube de 30ml contenant 10ml d'isopropanol et incubé à -20°C pendant 30mn. Après centrifugation à 20000g (10000 tpm) pendant 25 15mn, le culot d'ADN est séché en renversant le tube sur du papier absorbant pendant 10mn. L'ADN est repris dans 0,7ml de TE 50/10 (Tris 50mM, EDTA 10mM pH8) auxquels sont ajoutés 5 µl de RNase (5mg/ml) et incubé à 37°C pendant 10mn. L'ADN est extrait par un volume égal de phénol/chloroforme 1/1 et précipité à l'isopropanol

(1volume)/ NaOAc (3M) (1/10 de volume). Le culot d'ADN est séché et repris dans 10µl de TE 10/1 (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH8).

- Clonage

5

Première digestion. 0.5 µg d'ADN génomique d'*Arabidopsis* sont digérés avec PstI (BRL life technologies, 95613, Cergy-Pontoise), précipités à l'éthanol (2.5 volumes)/ NaOAc 3M (1/10 du volume) et remis en suspension dans de l'eau. 2.5 µg du vecteur pResc38 sont 10 digérés par PstI, déphosphorylés avec de la phosphatase alcaline d'intestin de veau (BRL), extraits avec un volume de phénol-chlorophorme (1/1) précipités à l'éthanol/ NaOAc, et remis en suspension dans de l'eau.

Première ligation. 0.5 µg d'ADN génomique digéré par PstI et 15 2.5 µg de pResc38 digéré par PstI et déphosphorylé sont mis à liguer dans 100 µl de volume total avec 5 unités de T4 ADN ligase (BRL), toute la nuit à 12°C.

Deuxième digestion. Le mélange de ligation précédent est 20 précipité à l'éthanol (2.5 volumes)/ NH4OAc 8M (1/2 du volume), remis en suspension dans de l'eau, et complètement digéré avec un deuxième enzyme de restriction : XbaI, dans un volume total de 100 µl en utilisant 20 unités d'enzyme de restriction. Le mélange est précipité à l'éthanol/NH4OAc et mis en suspension dans de l'eau.

Deuxième ligation. Afin de circulariser les molécules d'ADN, 25 une deuxième ligation est réalisée sur le produit de la deuxième digestion avec une concentration d'ADN plus faible, dans un volume total de 200 µl et en utilisant 5 unités de T4 ADN ligase. Le mélange est incubé toute la nuit à 12°C, puis précipité à l'éthanol/ NH4OAc, rincé 2 fois à l'éthanol 70% (v/v), séché, et repris dans 20 µl d'eau.

30

- Transformation

L'électroporation est réalisée grace à un appareil de type Gene-Pulser (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) avec un voltage de 1,5 kV.

5 Les cellules electrocompétentes DH10B electromax (BRL) sont rapidement décongelées puis placées sur la glace. Dans une cuvette d'electroporation froide (diamètre interélectrode de 1mm, Bio-Rad), sont mélangés 2 µl du produit de ligation précipité et 40 µl de cellules compétentes. Après électroporation, 1 ml de milieu SOC froid

10 (Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York) est ajouté immédiatement. L'ensemble est transvasé dans un tube de culture de 13 ml et incubé 2h à 37°C sous agitation.

Un volume de 250 µl de culture est étalé sur des boîtes de Pétri

15 LB-agar contenant 100 mg/l de carbenicilline et 50 mg/l de kanamycine et incubé à 37°C toute la nuit.

III – Clonage dans Pbin19

20 L'insert cloné dans le vecteur P38resc de "Kanamycin rescue" subit un clonage intermédiaire dans le vecteur Bluescript pBKS+ (Stratagène, San Diego CA92121) avant d'être cloné dans le vecteur binaire pBin19 en vue de la transformation des plantes. Ces clonages se font de manière directionnelle par double digestion EcoRI/XbaI.

25 Environ 250 ng de vecteur P38resc contenant l'insert et digéré par EcoRI et XbaI sont liqués avec environ 100 ng de vecteur KS+ digéré par les mêmes enzymes, non déphosphorylé, dans 40 µl de volume final avec 10 U de T4 ADN ligase (BRL). Après incubation une nuit à 12 °C, le mélange de ligation est précipité à l'éthanol/ NH₄OAc, 30 repris dans 10 µl d'eau et utilisé pour électroporer des bactéries NM522

(BRL), rendues électrocompétentes suivant la technique décrite par Sambrook et al., (1989). Les colonies positives blanches sont sélectionnées sur un milieu LB-agar contenant 40 mg/l de XGal, 8 mg/l d'IPTG (Genaxis Biotechnology, 78180, Montigny le Bretonneux) et 5 100mg/l de carbénicilline.

-Clonage dans pBin19.

L'insert contenu dans pBKS+, après digestion par EcoRI et 10 XbaI, est purifié par électroélution à partir d'un gel d'agarose à 1%, selon la technique de Sambrook et al., (1989). Pour le clonage, 100ng de l'insert de 4.3 kb et 100ng de vecteur pBin19 (12 kb) préalablement digérés par EcoRI et XbaI (soit un rapport molaire insert/vecteur de 3/1) 15 sont mélangés dans 40 µl de volume total avec 10 µl de ligase (BRL) et liqués sur la nuit à 12 °C. Après précipitation à l'éthanol/ NaOAc, le produit de ligation est repris dans 10 µl d'eau et utilisé pour réaliser l'électroporation des bactéries NM522. La sélection des colonies positives se fait sur des boîtes de Pétri avec un milieu LB-agar contenant XGal et IPTG, comme ci-dessus et 50mg/l de kanamycine.

20

IV – Méthode à l'exonucléase III

(*Current Protocols in Molecular Biology*, éditeurs: F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. 25 Struhl; published by Wiley Interscience)

Le fragment d'ADN d'intérêt de 4,3kb a été recloné dans un vecteur pBluescript II KS+ au site EcoRI du polylinker. Ensuite le plasmide de ce clone a été isolé et purifié par la méthode de "Qiagen-Midi-Preparation Tip 100(Qiagen) à partir d'une culture de 30 ml.

Pour pouvoir séquencer dans les deux sens, 5µg plasmide ont été doublement digérés par Xhol/KpnI d'une part et par SpeI/SacI d'autre part, dans un volume de 50 µl chaque fois. (100ng de plasmide linéarisé de chaque digestion a été gardé pour une vérification sur gel d'agarose).

- 5 Le reste du plasmide linéarisé à chaque digestion a été précipité à l'éthanol 95% (3 volumes) et NaOAc 3M (1/5 volume) pendant une heure dans la glace. Après 20 minutes de centrifugation à 13000 tpm et à +4°C , le plasmide digéré de chaque digestion a été rincé avec l'éthanol à 10 70%, séché au "speed-vac" pendant 5 minutes et repris dans 50µl de tampon ExoIII dilué à 1x (0,66M Tris/HCl pH=8,0 , 66 mM MgCl₂, 50mM DTT, 500µg /ml BSA; USB, United States Biochemicals).

- Pour créer les délétions de chaque côté, 25µl (2,5µg) de chaque digestion ont été préincubés à 37°C pendant 2 minutes, 0,8µl de ExoIII (100u/µl; USB), soit 150unités ExoIII par picomole d'extrémités 3', 15 ont été ajoutés et reincubés à 37°C. Toutes les minutes, 3µl (300ng) d'ADN ont été prélevés et placés immédiatement dans la carboglace (=8 prélèvements totaux). Puis 3µl d'eau ont été ajoutés à chaque prélèvement , incubés pendant 10 minutes à 70°C pour inactiver l'enzyme ExoIII. Tous les échantillons ont été placés dans la glace. 20 Après addition de 15 µl de tampon de nucléase S1 (300mM Na acétate pH 4,6 ,10mM Zn acétate, 50% v/v glycérol) et de 4µl (4 unités) de nucléase S1 (Gibco BRL) , ces échantillons ont été incubés pendant 20 minutes à température ambiante. La réaction de la nucléase S1 a été arrêtée en ajoutant 5µl de tampon "stop" (0,3M Tris/HCl pH 8,0 , 0,05M 25 EDTA) à chaque échantillon . Des fractions aliquotes de 8µl ont été prélevées pour une vérification sur gel d'agarose.

Le volume restant (22µl) de chaque échantillon a été incubé pendant 20 minutes à 37°C après avoir ajouté 2 unités de fragment de Klenow et 1µl de dNTP's à 0,25mM.

- 30 Enfin les molécules déletées ont été recircularisées en ajoutant 1µl (1 unité) de T₄DNA ligase (USB), 3µl de tampon 10x (660mM

Tris/HCl pH=7,6, 66mM MgCl₂, 100mM DTT, 660µm ATP) et 2µl d'eau à chaque échantillon. Les ligations ont été faites dans un volume total de 30 µl et incubées à 16 °C pendant la nuit.

Puis un tiers du volume (10µl) des produits issus de chaque ligation a été utilisé pour transformer 100µl de cellules compétentes *E.coli* DH5α par la méthode au Chlorure de Calcium (Current Protocols in Molecular Biology, éditeurs: F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl,; published by Wiley Interscience). Les cellules transformées de *E. coli* DH5α ont été sélectionnées sur LB-agar contenant de la carbénicilline à 100mg/l , 40 mg/l de XGal et 8 mg/l d'IPTG.

V – Extraction des ARN totaux

(Heim U., Weber H., Bäumlein H., Wobus U., 1993. A sucrose-synthase gene of *Vicia faba L.*: expression pattern in developing seeds in relation to starch synthesis and metabolic regulation. *Planta* 191: 3494-501)

Les tissus frais congelés (plantule ~2g et racine ~1g) ont été écrasés dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier et un pilon. Puis 500µl de tampon d'extraction (1M Tris/HCl pH 7,4 , 1% SDS , 5mM EDTA) pour 200mg tissu ont été ajoutés goutte à goutte, puis le même volume de phenol/chloroforme/isoamylalcohol, tout en continuant le broyage jusqu'à obtenir une poudre lisse. Après décongélation, chaque solution a été transférée dans un tube et centrifugée pendant 5 minutes à +4°C .

Chaque phase aqueuse a été réextraites deux fois avec le même volume de phénol/chloroforme/isoamylalcohol et précipitée à l'éthanol (3 volumes) / NaOAC (1/10 volume) pendant une heure à -80°C. Après centrifugation pendant 30 minutes à +4°C, chaque culot a été séché

brièvement et dissous dans de l'eau+DEPC . Une deuxième centrifugation pendant 10 minutes à +4°C a été faite et chaque surnageant a été mélangé avec le même volume de LiCl à 4M pour une précipitation des acides ribonucléiques dans la glace à +4°C pendant la
5 nuit.

Ensuite chaque solution a été centrifugée pendant 15 minutes et les culots d'ARN ont été lavés deux fois dans LiCl 2M et une fois dans de l'éthanol à 70% . Après un séchage au "speed-vac , chaque culot d'ARN a été dissous dans de l'eau+DEPC et la concentration d'ARN a
10 été vérifiée par spectrophotométrie.

VI – Test GUS

(Jefferson R. A., 1987. Assaying chimeric genes in plants: the *gus* gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**: 387.)

15

– Par histochimie

Quinze jours après la germination des transformants d'*Arabidopsis*, l' activité GUS est testée grâce à l'acide X-glucuronique
20 (X-Glu, Biosynth G. Staad, Suisse) comme décrit par Jefferson et al., modifié par l'utilisation de 100 mM KH₂PO₄, 0.4 mM de catalyseur K₃Fe(CN)₆ et 0.4 mM K₄Fe(CN)₆. Aucun bruit de fond n'a été observé dans les tissus des plantes non transformées.

– Par fluorimétrie

Les échantillons de plantes (racines ou feuilles) sont broyés en tube Eppendorf™ avec 200 µl de tampon d'extraction (50mM NaPO₄, 10 mM dithiothreitol, 10 mM EDTA, pH7) et une pincée de sable de Fontainebleau. Après centrifugation deux fois 10 min à 13000tpm à 4°C, le dosage d'activité GUS est réalisé sur le surnageant, dans 150µl de volume final contenant le substrat MUG (4-Methyl-β-D-glucuronide d'ombellifère, Sigma) à concentration finale de 3 mM.

Après 15 min d'incubation à 37°C, l'activité GUS est mesurée grâce à un appareil Fluoroskan II (Labsystems, 91944 Les Ulis, France) avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 365 nm et 455 nm, respectivement.

Les concentrations de protéines dans les extraits de plantes sont mesurées en utilisant le réactif de Bradford (Biorad).

Les concentrations d'ADN sont mesurées en utilisant le réactif de Hoechst (Sigma). La réaction se fait dans 200 µl de volume final (tampon Labarca-Paigen : 50 mM NaPO₄, NaCl 2M, EDTA 2mM, pH 7.5) contenant le réactif de Hoechst à 0.5 mg/ml.

20

EXEMPLE 1: Isolement d'une séquence nucléotidique d'environ 2,2 kb par piégeage de promoteur.

Une collection de transformants d'*Arabidopsis thaliana* (écotype WS) a été obtenue selon la technique décrite par Bechtold *et al.* (1993).

Les plantes ont été transformées par insertion aléatoire dans leur génome d'un ADN de transfert (ADN-T) transmis par la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*.

Cet ADN de transfert comporte un gène *gus* sans promoteur tel que décrit par Bouchez *et al.* (1993, C.R.A.S. Paris, volume 316:1188-1193).

La méthode de transformation *In planta* a été choisie et mise au point à la Station Génétique de Versailles de l'Institut National de la Recherche Agronomique selon la méthode décrite par Bechtold *et al.* (1993, C.R.A.S. Paris, volume 316:1194-1199). Cette méthode permet 5 d'obtenir rapidement un nombre élevé de transformants indépendants comportant un nombre limité d'insertions (1,5 insertions par transformant en moyenne).

Un criblage de l'expression du gène GUS par histochimie parmi les transformants selon la méthode décrite par Mollier *et al.* (1995, 10 C.R.A.S. Paris, volume 318: 465-474) a permis d'isoler un transformant présentant une activité GUS particulière:

- expression très forte spécifiquement dans la racine, et ce tout au long du développement, comme montré dans les clichés 15 correspondant à la figure 3a-c. La racine est colorée sur toute la longueur sauf la zone d'élongation (figure 3d).
- expression dans toutes les assises cellulaires de la racine (épiderme, cortex, endoderme, péricycle, vaisseau conducteur) telle que 20 cela peut être observé sur le cliché de la figure 4.

Ce transformant a été caractérisé plus avant par la technique de Southern blot (Southern E.M., 1975).

25 Une séquence d'environ 2,2 kb située en amont de la bordure droite de l'insertion, correspondant au promoteur, a été clonée par la technique de « Kanamycin Rescue » selon la technique décrite par Bouchez *et al.* (1996, Plant Mol. Biol. Rep. vol.14:115-123).

Le vecteur de « Kanamycin rescue » est représenté en figure 7.
30

EXEMPLE 2 : Recherche de la séquence complète du promoteur selon l'invention.

35 Le fragment d'ADN de 2,2 kb a été utilisé comme sonde pour rechercher le promoteur entier dans une banque d'ADN génomique

d'*Arabidopsis thaliana* d'écotype Columbia (J.T. Mulligan, Stanford CA 94305).

Deux phages d'environ 15 kb ont été sélectionnés (clones lr1 et lr2).. Ces deux clones de phages comportaient un insert correspondant à 5 un fragment génomique de 4,413 kb (SEQ ID N°3) et contenant la séquence de la sonde. L'insert de ces deux phages a été entièrement séquencé par la méthode à l'exonucléase III décrite par Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, éditeurs. F.M. AUSUBEL, R. BRENT., R.E. KINGSTON, D.D. MOORE, J.G. SEIDMAN, J.A. SMITH, 10 K. STRUHL; published by Wiley Interscience). Il s'agit de la séquence SEQ ID N°3 . Le début de la séquence correspondant à l'ADN-T est localisé à partir du nucléotide en position 2285 de la séquence SEQ ID N°3.

L'expression spécifique du gène gus a été mise en évidence 15 par des expériences de Northern blot sur des ARN totaux extraits de transformants homozygotes pour l'insertion.

Les résultats d'une expérience de Northern blot sont représentés à la figure 5.

Un transcrit d'environ 2 kb est mis en évidence sur les ARN de 20 racine et n'est pas détectable sur les ARN des parties aériennes (figure 5).

Les ARN totaux ont été extraits de racines et de parties aériennes de la lignée transformée selon la méthode décrite par Heim *et al.* (1993, *Planta*, vol. 191: 3.494, 3501).

25 En vue de mettre en évidence un éventuel transcrit endogène correspondant au promoteur, des gels de Northern ont été réalisés sur des ARN totaux extraits de plantes non transformées, et hybridées avec le fragment génomique de 4,413 kb (SEQ ID N°3) qui contient environ 2,2 kb en aval du promoteur.

30 Aucun transcrit n'a été détecté avec cette sonde.

En outre, deux banques d'ADNc d'*Arabidopsis thaliana* indépendantes (une banque d'ADNc de racines et une banque d'ADNc de plantes entières) ont été criblées avec cette même sonde de 4,413 kb.

A nouveau, les résultats ont été négatifs et aucun ADNc correspondant au promoteur n'a été trouvé.

Enfin, aucune phase codante n'a pu être mise en évidence en aval du promoteur en utilisant les logiciels classiques de prédition.

5 Logiciels Net Plant Gene et Net Gene 2:

S.M. Hebsgaard et al.(1996).

Brunak S. et al. (1991).

Logiciel Genscan:

Burge, C. et al. (1997);

10 Burge, C.B. (1998).

La séquence de 4,413 kb (SEQ ID N°3) est très riche en bases A et T (68% de A et de T) et comporte 67 motifs ATG, 20 motifs CAAT, 38 motifs TATA, 9 motifs TATAAT et 2 boîtes Cr.

15 Les résultats obtenus indiquent qu'aucun transcrit n'est décelable en aval du promoteur étudié. Il s'agirait donc d'un promoteur cryptique.

EXEMPLE 3: Mise en évidence de l'activité promotrice.

20

L'activité promotrice a été démontrée en réalisant une retransformation *in planta* d'*Arabidopsis thaliana* (écotype WS) par ce promoteur de 2,2 kb placé en amont du gène rapporteur *gus*.

25

Pour cette expérience, la construction suivante a été réalisée, qui est représentée sur la figure 2: un fragment d'environ 4,27 kb compris entre les sites XbaI et EcoRI du vecteur de « kanamycin Rescue » (cf. figure 7) a été cloné dans l'ADN-T du vecteur pBin19 selon la technique décrite par Bevan M. (1984, Nucleic Acid Research vol.12: 8711-8721).

30

Ce fragment d'ADN de 4,27 kb est inclus dans la séquence SEQ ID N°4, cette séquence comprenant également un polysite de clonage du vecteur P38, comme décrit ci-après.

Il comporte: les sites de clonage de P38: XbaI, Spel, BamHI, SmaI, PstI (nct 1 à 29), la séquence promotrice SEQ ID N°1 (nct 30 à

2178) et la séquence du gène *gus* de l'ADN-T de PGKB5 jusqu'au site EcoRI (nct 2179-4309).

5 **EXEMPLE 4: Transformation de plantes d'*Arabidopsis thaliana* avec la construction contenant le gène *gus* placé sous le contrôle du promoteur.**

10 Des plantes d'*Arabidopsis thaliana* ont été transformées via *Agrobacterium tumefaciens* avec la construction 1 décrite dans la figure 2 et neuf transformants individuels ont été étudiés pour l'expression du gène *gus*, d'abord en histochimie.

15 L'expression du gène *gus* a également été quantifiée par dosage fluorimétrique selon la technique décrite par Jefferson (1987, Plant, Mol. Biol. Rep. volume 5: 387), modifiée par l'utilisation de 5mM de substrat dans les racines d'une part, et dans les parties aériennes (cotylédons, feuilles, tiges), d'autre part, et ce, à plusieurs stades du développement des plantes.

20 L'activité du gène *gus* des neuf transformants a été comparée à celle du transformant initial.

Les résultats sont représentés sur le tableau I ci-après.

25 Pour le transformant de départ ACC₆H, à l'état homozygote, ou ACC₆T₃, en ségrégation, l'activité du gène *gus* dans les racines diminue avec l'âge de la plante, alors qu'une faible activité dans les parties aériennes devient détectable en fin de développement.

30 Pour 6 des 9 transformants étudiés (transformants 6i, 6h, 6-1, 6-2, 6-3 et 6a) l'activité du gène *gus* dans les racines est encore plus forte que dans celle du transformant de départ (4 à dix fois) et l'activité dans les feuilles devient plus facilement détectable.

Cependant, le rapport activité du gène *gus* dans les racines/activité du gène *gus* dans la feuille reste constant.

Pour ces transformants, la spécificité racinaire est donc inchangée par rapport au transformant de départ. Seul le niveau d'expression du gène *gus* est globalement plus élevé.

Pour 3 des transformants (6b, 2b et 6k) le rapport activité du gène *gus* dans la racine/activité du gène *gus* dans la feuille est plus faible que dans le transformant de départ; l'expression du gène *gus* est donc moins spécifique des racines pour ces transformants.

5 La diminution de l'activité GUS dans les racines au cours du développement est illustrée en figure 6, pour le transformant initial (a) et deux transformants caractéristiques (b et c). Pour le transformant initial, l'activité dans les feuilles n'est pas détectable. Pour le transformant 6-1, elle est faiblement détectable, et le rapport activité GUS racine/feuille est 10 le même que pour le transformant initial. Pour le transformant 2b par contre, l'activité GUS dans les feuilles est plus élevée, et le rapport racine/feuille est nettement diminué.

EXEMPLE 5 : Etude de délétions du promoteur selon l'invention

15 Des délétions du promoteur ont été obtenues selon la méthode à l'exonucléase III décrite dans la partie Matériels et Méthodes (Section IV) afin d'obtenir des fragments fonctionnels du promoteur.

20 ***Digestion du fragment génomique à l'aide de l'exonucléase III***

En premier lieu, le fragment génomique de 4.3 kb (sequence SEQ ID N° 3) a été cloné dans un vecteur pBluescript KS+, au site EcoRI, puis a subi des digestions partielles en 5' par l'exonuclease III.

25 Clonage des fragments obtenus dans un vecteur d'expression fonctionnel chez les plantes

Afin de tester l'activité promotrice des fragments déletés du promoteur, les fragments obtenus après digestion enzymatique à l'aide de l'exonucléase III dans le vecteur pBluescript KS+, ont été amplifiés 30 puis clonés dans un vecteur possédant le gène *gus*.

Les fragments du promoteur sont amplifiés par PCR à l'aide de 2 amorces portant des sites enzymatiques, respectivement:

- en 5' du promoteur, on utilise l'amorce T7-HindIII, située dans le vecteur KS+ ;
- en 3' du promoteur, on utilise une amorce choisie dans la séquence génomique de 4.3kb et portant un site BamHI:

5

Il s'agit des amores suivantes :

- a) amorce T7-HindIII, en 5': GGC AAG CTT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C (SEQ ID N°6), qui possède la séquence "AAGCTT" reconnue par l'endonucléase de restriction Hind III.
- 10 b) amorce en 3': CTA GGG ATC CAG CCA TTC CCT ATG C (SEQ ID N°7), qui possède la séquence "GGATC/C" reconnue par l'endonucléase de restriction BamHI. La séquence de cette amorce située du côté 5', par rapport au site BamHI est complémentaire de la séquence allant du nucléotide en position 2400 jusqu'au nucléotide en 15 position 2386 de la séquence SEQ ID N°3.

Protocole d'amplification par PCR

Sont mélangés pour chaque échantillon:

- 20 40 µl d'H₂O
- 5 µl tampon PCR 10x
- 1 µl dNTP 10 mM
- 1 µl enzyme pfu-turbo DNA polymérase (à 2.5 u/µl, Stratagène)
- 1 µl d'amorce T7-Hind III (à 10 mM)
- 25 1 µl d'amorce 4.4-BamHI (à 10 mM)
- 1 µl d'ADN matrice (10 ng d'ADN du clone d'exonucléase choisi)

Réaction PCR ::

- L'amplification proprement dite est réalisée dans les conditions
30 suivantes :

- a) Etape de dénaturation pour l'obtention de fragments d'ADN simple brin à 94°C pendant 4 minutes ;
- b) Trente cycles d'amplifications réalisés dans les conditions suivantes :
 - 5 - dénaturation à 94°C pendant 30 secondes ;
 - hybridation des amorces à 50°C pendant 45 secondes ;
 - elongation des amorces à 72°C pendant 3 minutes
- c) Dernière étape d'elongation réalisée à 72°C pendant 10 minutes.

10 Les fragments de promoteur ainsi amplifiés comportent donc les sites Hind III, du côté 5', et BamHI, du côté 3'.

Les fragments amplifiés sont ensuite clonés au niveau des sites Hind III et BamHI, donc de façon orientée, dans le vecteur pC-gus dont la carte détaillée est représentée à la Figure 10. Le clonage a été réalisé
15 conformément à la technique décrite dans la partie Matériels et Méthodes (Section III) pour le vecteur pBin19.

Les fragments clonés en amont du gène *gus* dans le vecteur pC-gus sont les suivants :

20 - Le fragment allant du nucléotide en position 1 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3 ;

Le fragment allant du nucléotide en position 493 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3 ;

25 Le fragment allant du nucléotide en position 1076 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3 ;

Le fragment allant du nucléotide en position 1976 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3 ;

Le fragment allant du nucléotide en position 2040 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3 ;

Transformation de cellules d'Agrobacterium tumefaciens avec les vecteurs recombinants contenant divers fragments du promoteur selon l'invention

5 Les vecteurs pC-gus contenant les différents inserts sont ensuite transférés dans la souche d'Agrobactérie et des plantes d'*Arabidopsis* WS sont transformées conformément au protocole décrit à la Section I de la partie Matériels et Méthodes.

10 Les graines des transformants primaires sont sélectionnées sur un milieu sélectif contenant de l'hygromycine (30 mg/l).

15 La descendance de 20 transformants primaires par construction est semée sur milieu hygromycine afin de sélectionner les transformants possédant un seul locus d'insertion de l'ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*. Les homozygotes de ces transformants sont étudiés pour l'expression de la protéine GUS dans les racines et dans les feuilles, à la fois qualitativement par histochimie et quantitativement par fluorimétrie, conformément aux protocoles décrits dans la Section VI de la partie Materiels et Méthodes.

TABLEAU 1

33

	Jour 12 racine feuille rapport racine/ feuille	Jour 19 racine feuille rapport racine/feuille	Jour 26 racine feuille rapport racine/feuille	Jour 33 racine feuille rapport racine/ feuille
Transfor- mant				
ACC6H	4,06 0,02	4,19 0,09	47 47	1,55 0,05
ACC6T3	4,39 0,02	3,98 0,09	44 44	1,3 0,04
6i	16,42 0,05	12 0,25	48 48	4,93 0,12
6h	25,87 1,39	19 4,94	0,17 0,17	29 29
6.1	32,05 1,01	32 32	0,6 37	7,9 0,56
6.3	40,61 1,84	22 7,75	0,45 0,45	17 17
6.2	48,87 1,61	30 6,49	0,17 0,17	38 38
6a	6,93 0,14	50 1,4	0,01 0,01	140 140
6b	8,62 0,73	12 5,43	0,78 0,78	7 7
2b	33,02 4,91	7 4,93	1,31 1,31	4 4
6k	107,93 11,57	9 32,3	3,09 3,09	10 10
WS	-0,06 0,33	0,1 0,07	0,07 -0,01	0 0

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

- F.M. AUSUBEL, R. BRENT, R.E. KINGSTON, D.D. MOORE, J.G. SEIDMAN, J.A. SMITH, K. STRUHL; 1989, Current Protocols in Molecular Biology published by Wiley Interscience.
- BASTOLA, D.R., PETHE, V.V. and WINICOV, I. (1998). Alfin 1 , a novel zinc finger protein in alfalfa roots that binds to promoter elements in the salt inducible MSPRP2 gène, Plant. Mol. Biol. 38, 1123-1135).
- BECHTOLD N. , Ellis J. PELLETIER G., 1993. *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C.R. Acad. Sci. Paris 316: 1194-1199.
- BOUCHEZ D., CAMILLERI C., CABOCHE M. 1993. A binary vector based on Basta resistance for *in planta* transformation of *Arabidopsis thaliana*. C.R. Acad. Sci. Paris 316: 1188-1193.
- BEVAN M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. Nucleic Acid Research 12: 8711-21.
- BRUNAK S. ENGELBRECHT, J. and KNUDSEN, S.: Prediction of human mRNA Donor and Acceptor Sites from the DNA sequence. Journal of Molecular Biology, (1991), 220, 49-65.
- BURGE, C. and KARLIN, S. (1997). Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. J. Mol. Biol. 268, 78-94, BURGE,

C.B. (1998). Modeling dependencies in pre-mRNA splicing signals. In SALZBERG, S. SEARLS, D. and KASIF; S. eds. Computational methods in molecular biology. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 127-163.

5

- BOUCHEZ D., VITTORIOSO P., COURTIAL B. CAMILLERI C., 1996. Kanamycin Rescue: A simple technique for the recovery of T-DNA flanking sequences. *Plant Mol. Biol. Rep.* 14: 115-123.

10

- BOUCHEZ D. CAMILLERI C., CABOCHE M., 1993. A binary vector based on Basta resistance for *in planta* transformation of *Arabidopsis thaliana*. *C.R. Acad. Sci. Paris* 316: 1188-1193.

15

- CRAWFORD, N.M. and GLASS, A.D.M. 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science*, 3, 389-395.

20

- CORMACK , B.P. VALDIVIA, R.H. FALKOW, S. (1996), FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP) *Gene* 173: 33-38.

25

- JEFFERSON R. A., 1987. Assaying chimeric genes in plants: the *Gus* gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387.

30

- HEBSGAARD S.M., P.G. KORMING, N. TOLSTRUP, J. ENGELBRECHT, P. ROUZE, S. BRUNAK: Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* DNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Research*, (1996), Vol.24, N°17, 3439-3452.

35

- HEIM U. WEBER H., BAUMLEIN H. WOBUS U. 1993. A sucrose-synthase gene of *Vicia faba* L. Expression pattern in developing seeds in relation to starch synthesis and metabolic regulation.
5 *Planta* 191: 3494-501.

- HESSE, H. SONNEWALD, K. and WILLNITZER, L. (1995). Cloning and expression analysis of sucrose-phosphate synthase from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) *Mol. Gen. Genet.* 247, 515-520).

- HWANG et al., (1995). An *Arabidopsis thaliana* root specific kinase homolog is induced by dehydration, ABA, and NaCl. *Plant J.* 8: 37-43.
15

- HWANG I., GOODMAN, H.M. (1995). An *Arabidopsis thaliana* root specific kinase homolog is induced by deshydration, ABA, and
20 NaCl, *The Plant Journal*, 8, 37-43).

- LEAH, R. TOMMERUP, H. SVENDSEN, I. and MUNDY, Y. (1991). Biochemical and molecular characterization of three barley seed
25 proteins with antifungal properties . *J. Biol. Chem.* 266, 1464-1573).

- MALAMY, Y.E., BENFEY, P.N. (1997). Analysis of scarecrow expression using a rapid system for assessing transgene expression in *Arabidopsis* roots. *Plant Y.* 12: 957-963.
30

- MOLLIER P., MONTORO P., DELARUE M. BECHTOLD N. BELLINI C., PELLETIER G., 1995. Promoterless gus A expression in a large number of *Arabidopsis thaliana* transformants obtained by *in planta* infiltration method. *C.R. Acad. Sci. Paris* 318: 465-474.
35

- SOUTHERN , E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-577.
- 5
- WINICOV, DEUTCH, C.E. (1994). Characterization of a CDNA clone from salt tolerant alfalfa cells that identifies salt-inducible root specific transcripts) *J. Plant. Physiol.* 144, 222-228).
- 10 • YANG T.T. CHENG, L. KAIN, S.R. (1996) Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res.* 24: 4592-4593.

REVENDICATIONS

1. Acide nucléique comprenant tout ou partie d'un promoteur végétal capable de diriger l'expression d'une séquence nucléotidique d'intérêt dans les cellules de la racine d'une plante, durant la totalité du
5 développement de cette dernière caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'un polynucléotide possédant au moins 80 % d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique SEQ ID N° 1, ou un acide nucléique de séquence complémentaire, à l'exception de la séquence référencée sous le N°AC 007 289 dans la base de donnée EMBL.

10

2. Acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'un polynucléotide hybridant, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°1, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.
15

3. Acide nucléique selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend l'une des séquences suivantes:

20 - le polynucléotide allant du nucléotide en position 1 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3;

- le polynucléotide allant du nucléotide en position 493 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3;

25 - le polynucléotide allant du nucléotide en position 1076 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3;

- le polynucléotide allant du nucléotide en position 1976 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3; et

- le polynucléotide allant du nucléotide en position 2040 jusqu'au nucléotide en position 2400 de la séquence SEQ ID N°3.

30

4. Acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle du promoteur végétal.

5 5. Acide nucléique selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il s'agit de la séquence nucléotidique SEQ ID N° 2.

10 6. Acide nucléique selon la revendication 4, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique d'intérêt est choisie parmi les séquences codantes de gènes interagissant avec des parasites ou des pathogènes, les séquences codant les endochitinases, les séquences codant pour des protéines de protection de la plante au stress hydrique ou salin, ou encore des gènes agissant sur la teneur en sucre de la plante ou sur le transport de nitrate.

15 7. Acide nucléique comprenant 10 à 2000 nucléotides consécutifs d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 4, utile comme sonde ou amorce nucléotidique.

20 8. Vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 7.

25 9. Vecteur recombinant selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les vecteurs Pbin19, 101, pBi221, pBi121 et pC-gus.

30 10. Vecteur recombinant selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce qu'il s'agit du vecteur contenu dans la souche d'*E. Coli* déposée à la CNCM le 25 Mai 1999 sous le Numéro d'accès I-2218.

11. Cellule hôte recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 7 ou un vecteur recombinant selon l'une des revendications 8 à 10.

5 12. Cellule hôte recombinante selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est d'origine bactérienne ou végétale.

10 13. Cellule hôte recombinante selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule d'*Agrobacterium tumefaciens*.

14. Cellule hôte recombinante selon l'une des revendications 11 à 13, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de la souche d'*E. Coli* déposée à la CNCM le 25 Mai 1999 sous le Numéro d'accès I-2218.

15 15. Organisme multicellulaire végétal recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend une cellule hôte recombinante selon l'une des revendications 11 à 13.

16. Plante transgénique comprenant, sous une forme intégrée
20 dans son génome, un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 7.

17. Plante transgénique selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un colza, d'un tabac ou d'un maïs.

25 18. Procédé d'obtention d'une plante transgénique caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) Obtention d'une cellule hôte recombinante végétale selon
30 l'une des revendications 11 ou 12 ;

b) Régénération d'une plante entière à partir de la cellule hôte recombinante obtenue à l'étape a).

5 c) Sélection des plantes obtenues à l'étape b) ayant intégré la séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle du polynucléotide promoteur végétal.

10 19. Procédé d'obtention d'une plante transgénique caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) Obtention d'une cellule hôte recombinante d'*Agrobacterium tumefaciens* selon la revendication 13 ;

15 b) Transformation de la plante d'intérêt par infection avec la cellule hôte recombinante obtenue à l'étape a).

20 c) Sélection des plantes ayant intégré la séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle du polynucléotide promoteur végétal.

20 20. Procédé d'obtention d'une plante transgénique caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

25 a) transfacter une cellule de plante avec un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 7 ou un vecteur recombinant selon l'une des revendications 8 à 10;

30 b) régénération d'une plante entière à partir des cellules de plantes recombinantes obtenues à l'étape a) ;

c) sélection des plantes ayant intégré la séquence nucléotidique d'intérêt placée sous le contrôle du polynucléotide promoteur végétal.

5 21. Procédé d'obtention d'une plante transgénique selon l'une des revendications 18 à 20, caractérisé en ce qu'il comporte en outre les étapes de :

d) croisement entre elles de deux plantes transgéniques telles qu'obtenues à l'étape c) ;

10

e) sélection des plantes homozygotes pour le transgène.

15 22. Procédé d'obtention d'une plante transgénique selon l'une des revendications 18 à 20, caractérisé en ce qu'il comporte en outre les étapes de:

d) croisement d'une plante transgénique obtenue à l'étape c) avec une plante de la même espèce ;

e) sélection des plantes issues du croisement de l'étape d) ayant conservé le transgène.

20

23. Plante transgénique, telle qu'obtenue selon le procédé selon l'une des revendications 18 à 22.

25 24. Semence de plante dont les cellules constitutives comprennent dans leur génome un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 7.

25. Semence d'une plante transgénique selon l'une des revendications 16, 17 et 23.

1/22

Tsp 509I		Hpa II	Rsa I
Taq I		Bsr FI	Csp 61
Mla III		Tat I	Bst 111
Cvi AII			
GTCGAATTGTGATATACTGGAAAGCAATCTGAAAAGAATAAGTGGGATATATAACAAACCCGGCGAAAGTACAAGTTCTACC CAGCTTAACACTATATAACATTGTTAGACTTTCTTATTCAACCTATATAATTGTTGCCGCCTTCATGTTCAAGATGG			80
2	.	57	66
5	.	58	67
			67
Nla IV		T7E I	
Mla III		Hinf I	
Cvi AII		Tsp 509I	Tsp 509I
TTTTTTGGCATGGAACCATGTTTAGGATTTACTTTGAAATTCTGAAATCTTCATTCTCTGAAATTGATATTTACATT AAAAAACCGTACCTGGTACAAAATCCTAAATGAAACATTAAGGACTTAGAAAGTAAAGAACCTAAACTATAATGTA			160
90	98	121	.
90	98	128	145
93	.	128	.
Rsa I		Mse I	
Csp 61		Dra I	
Tat I		Tsp 509I	
TTTATCAAAAGGAGTACAAGTTCTACCAAAGCACAGGAGTTAACAACTTGTGTCRAATGCTAATTAAAGCCTAA AAATAGTTTTTCATGTCAGATGGTTCTGTCCTCAATTGTGAAACACACAGTTACGATTAATTTCGGATT			240
175	.	202	227
176	.	.	229
176	.	.	230
			234
Mbo II		Cvi RI	Mse I
		Tth 111 I	
TCTTATGATTTCCCTTTCTCACGATATATACTGATATTGATATGACCCATTGTTGTCATTAACCTCCACTCTAT AGAATACTAAAGGGAAAAGTGTCTATATGACTATAACTATACGTGGTAACAAACAGTAATTGAGGGTGACATA			320
258	.	285	295
		.	304
Bae I	Taq I	Cje I	Bsr I
			Bst 217 I
ACATCAGTATCTAAAGTGAATAACAAATATCCATAAGAAGTGGTATATTGTGAAAAAAAAAAAGTGGTATACTG TGTAGTCATAGTTCTACGTTATTGTATAGGTATTCTACCTATACACTTTTTTTTACCATATGAC			400
321	338	352	393
			393
			397
Bsm AI		Bsm AI	
Bsa I		Tai I	
Bst 4CI		Mae II	
Bst DSI	Tsp 509I	Bfa I	Afl III
Bsa JI	Taq I	Mli I	
CATATATACAATACCAACGGTCTCGAAATTGCTCAACAAATTCTAGGAGAAAATGGACGTCTCTTGGTTTATTTTATT CATATATGTTATGGTGCACAGCTTAACCGAGTTGTTAAAGCTCTTACCTGCACAGAAACCAAATAAAATAA			480
413	421	429	436
413	424	.	441
415	.	.	455
417	.	.	455
418	.	.	455
			459

Figure 1 (1)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

2/22

MseI TagI ApoI Tsp509I
 DraI MsII BsmAI MseI BstBI ApoI Tsp509I
 CTTAATAACATACCTATATTAAACACTTCGATGTCGTTAAATTGGAAATGCGCTAAATTCTTAATCATAAA 560
 GAATTATTGTAGAGATATAAAATTGAGCTACAGGGAAATTAAAGCTTACACGGATTAAAGAGATTAGTATT
 482 501 507 516 523 529 542
 502 511 525 526 543
 530
 CviRI Ppu10I NsiI SfrBI MaeIII
 NlaIII TaiI CviAII MaeII
 Tsp509I CviJI Bsp1286I BsaAI MseI MseI
 ApoI TagI BsmFI Bsp1286I DraI AseI
 TCGTAAAGAAAAATTGCTGAAGCCACAGGGACATGCAAGGGCACGTAGTTACCTTTAAACCATCAAAAATATAATTAA 640
 AGCATTTCTTTAACGAGCTTCGGTGTCCCTGTACGTATCCGTGATCAATGAAATTTCGTAGTTTATATAATTAA
 570 577 588 600 615 635
 571 581 591 603 616 636
 592 604
 592 604
 593 609
 593
 593
 594
 HaeIII GdIII
 Tsp509I CjePI BaeI MboII MaeII Pvu4HI
 MseI TaiI CviJI
 TCGTAAAGAAAAACTTCTAAAGAACATTAAATAAAAGTGATAAAAAAGATAAGAAGGTAGGCAGAAGAAAACGTATGG 720
 AGAAAAGGAAACTTCTAAAGAACATTAAATAAAAGTGATAAAAAAGATAAGAAGGTAGGCAGAAGAAAACGTATGG
 TCTTTCTTGTAGGATTTCCTGTAAATTATTCACCTTTTCTTATCTTCCATCCGTCTCTTGTACCC
 666 706 713 720
 669 709 718
 713 719 718
 719
 SchI PleI BsmFI
 MlyI TaiI BsmHI
 Hinfl MaeII BsmBI
 SclI BsaHI MwoI BsmBI
 BstUI BsmFI Scl132I AciI BceI HgaI
 AcI I MaeIII AatII TspRI BsmAI BsmAI
 CCGGACTCTAACAAACGGACGTCGGACCAACTGGGAGACGGGAGACGGCTGACTGATTTTCTTTCTAA 800
 GGGCTGACATGTTCCCTGAGGGCTGGTGACCCCTGCCCCCTGCGACTGACTAAAAAGAAAAAGAAAAACGATT
 721 730 739 750 757 765
 722 737 744 754 760 767
 722 739 754 765
 725 740 757
 725 740
 725 742
 725
 MnlI
 MboI DpnI Chai BspKT6I
 MaeII AlwI BstYI
 TaiI Tsp509I MfeI
 MaeII SimI
 AcI I 824 840 841
 AGAACGTTGTTGGTACAAGGGTAAACCATATCCAATTGGTCTGGCTATTATTATATAACTAAAGATCCCCCTCT 880
 TCTTGCACAAAGCACGAATGTTCCAGTTGGTATAGGTTAACAGACGGATAATATATATTGATTCTAGGGAGA
 803 824 840 870
 804 841 871
 804 871
 871
 871

Figure 1(2)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

3/22

Figure 1 (3)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

4/22

TagI
Tfi I CvI JI
HinfI
Tth111II AluI BsaBI
NlaIII
CviAII
BspHI
SimI MboII
BaeI
BstZ17I
AccI
AAATAAGTTGATTCCAGCTTCCAAGATATAATCTTTTTAGATGGGTCAAGAAGATTTCTAACCTCGTATACGAG 1600
TTTATTCAACAAACTAAGCTCGAAGGTTCTAATATTAGAAAAATCTACCCAGTACTTCTAAAGATTGAAGCATATGCTC
1529 1540 1549 1569 1576 1592
1534 1540 1572 1592
1537 1573 1596
CjePI Tsp509I TaiI MaeII CviJI Hgal BsmAI
BciVI Tsp509I MaeII CviJI BsaI
TGATATCCATATAATTCTAACATATAACGTCTGTTGGTAGGCCTGGCTCTGGCTCTGGAGACCACCCCCCTGGCTAATGTT 1680
ACATAGCTATTTAAAGATTGTAATGGAGAACAAAACCATTGGAGACGGAGAAAACCTGGTGGGGGAACGATTACAA
1602 1612 1626 1643 1658
1606 1626 1649 1658
SchI PleI
TaiI MaeII BsaAI
MaeIII TagI VpaK11AI ApoI HaeIII
DdeI TaiI MlyI MslI Sau96I MseI CvI JI
CviRI CjeI MaeII HinFI CvIRI FmuI DraI MscI
1685 1700 1707 1716 1726 1737 1748 1758
1690 1707 1716 1728 1737 1749 1758
1709 1719 1737 1750 1751 1759
1711 1737 1751 1759
1712 1753 1759
1712 1754
1716
1716
Sfani
BscAI
CviRI
Ppu10I
NsiI
BfrBI
NlaIII
Tsp509I CvI AII
ApoI NspI Tsp509I
Tth111II Tth111II ApoI
CCACAAAACAACATTACACAAACATGCGTTCACAAATTTTATTCATGGCGTATTGTT 1840
GGTGTGTTGTTGAAATGTTGTTAAGTTGTTGACGTGCAAAAGTTAAATAATAAGTTACCGCAATAACAAG
1779 1792 1809
1784 1795 1810
1785 1796
1796
1797
1797
1797
1798
1799
1799
1799
Tsp509I
SspI MseI TspRI ApoI MseI MboII CjeI
ATTGAAATATTCTGTTAACACTGACGAATTTTTAAATTCTAACAAAGAAGAACATTGATATAAAATAACATTAA
TAACATTATAAGACAAATTGAGTGACTGCTTAAAGTTCTCTGTTAAACTATATTATTGTAAAAT 1920
1847 1857 1863 1870 1877 1890 1913
1871 1879

Figure 1 (4)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

5/22

<i>MseI</i> <i>BsrFI</i> <i>BsaWI</i> <i>TagI</i> <i>AgeI</i> <i>CviJI</i> <i>NlaIV</i> <i>HpaII</i> <i>AluI</i> TGGAACCACCGGTTAACGCTCGATGATTAGTTAGTTAGTCGTTTGTGAAATCATTAAACGACCTACATTGATCC ACCTGGTGGCCAATTGGAGCTACTAAAACCTAAACAGCAAAACACTTTAGTAATGGATGTAACACTAGG 1922 1929 1936 1928 1936 1928 1939 1928 1933	<i>MnlI</i> <i>MboI</i> <i>DpnI</i> <i>ChaI</i> <i>BspKI6I</i> <i>AlwI</i> <i>MseI</i> 1980 1996 1996 1996 1996 1996 1996 1996 2000
<i>TfiI</i> <i>NlaIII</i> <i>Tsp509I</i> <i>Tth11II</i> <i>MseI</i> <i>HinfI</i> <i>CviAII</i> <i>MseI</i> <i>HphI</i> CTCATTACTTTAATAATTAGGAATCAAACATGATGATTAAGTCACCAAGACGCTCTTATGGCTATTAAAGAGTCAGAC GAGTAATGAAATTATTAACCTTAGTTAGTACTACTAAATTCAGTGTTCTGCAGAGAATACCGATAATTCTCAGTCG	
 2010 2021 2029 2037 2043 2051 2063 2072 2015 2025 2029 2037 2043 2051 2068 2078 2052 2052 2052 2053 2054	<i>BsmAI</i> <i>BsmBI</i> <i>TaiI</i> <i>PleI</i> <i>MaeII</i> <i>MlyI</i> <i>BsaHI</i> <i>MseI</i> <i>HgaI</i> <i>AatII</i> <i>CviJI</i> <i>HinfI</i> 2051 2072 2052 2072 2052 2072 2053 2072 2054
<i>Sth132I</i> <i>ScrfI</i> <i>NciI</i> <i>HpaII</i> <i>EcoHI</i> <i>TaiI</i> <i>PshAI</i> <i>MaeII</i> <i>StsI</i> <i>BesKI</i> <i>BsaHI</i> <i>FokI</i> <i>BsaJI</i> <i>AacII</i> <i>BstF5I</i> <i>SimI</i> <i>MseI</i> <i>Tsp509I</i> <i>MseI</i> GCAAGGATGACCGGGGTCAATTAAAGACGTCTTATATTCAACCTTACTCCACTAATTGCTAAATTAACTAG CGTTCTACTGGCCCCAGTAATTCTGCAGAATATAAGTTGGTAATGAGGTGATTAACGGATAATTAGTC	
 2085 2094 2100 2133 2142 2085 2091 2104 2140 2085 2091 2104 2141 2089 2105 2091 2091 2091 2091 2092	<i>AseI</i> 2140 2141

Figure 1(5)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

6/22

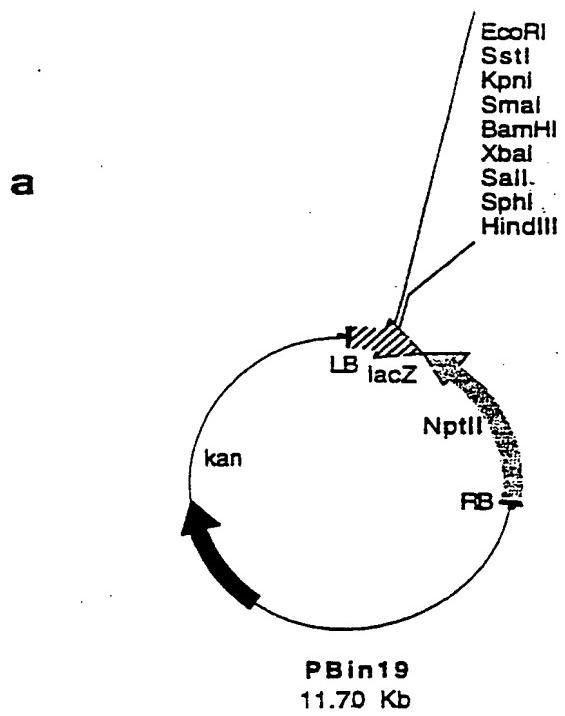
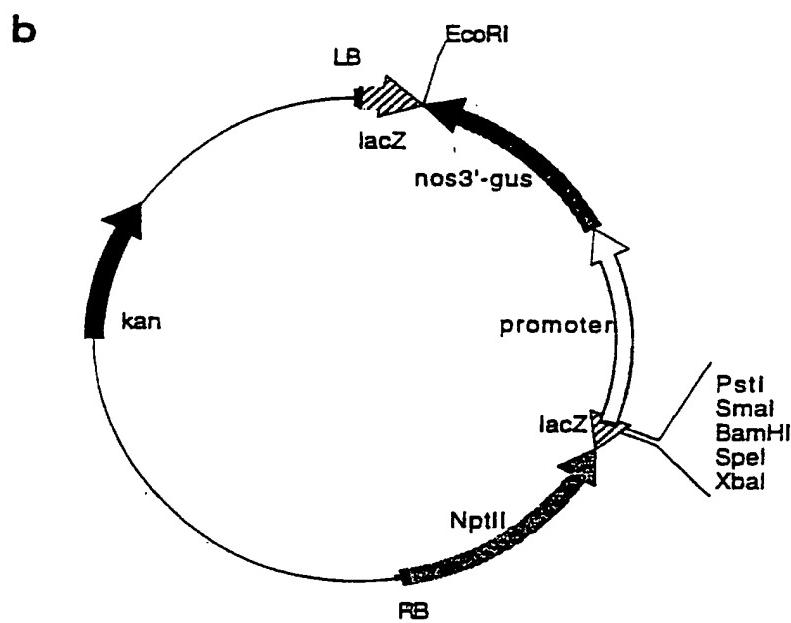


Figure 2 (a)

FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)

7/22

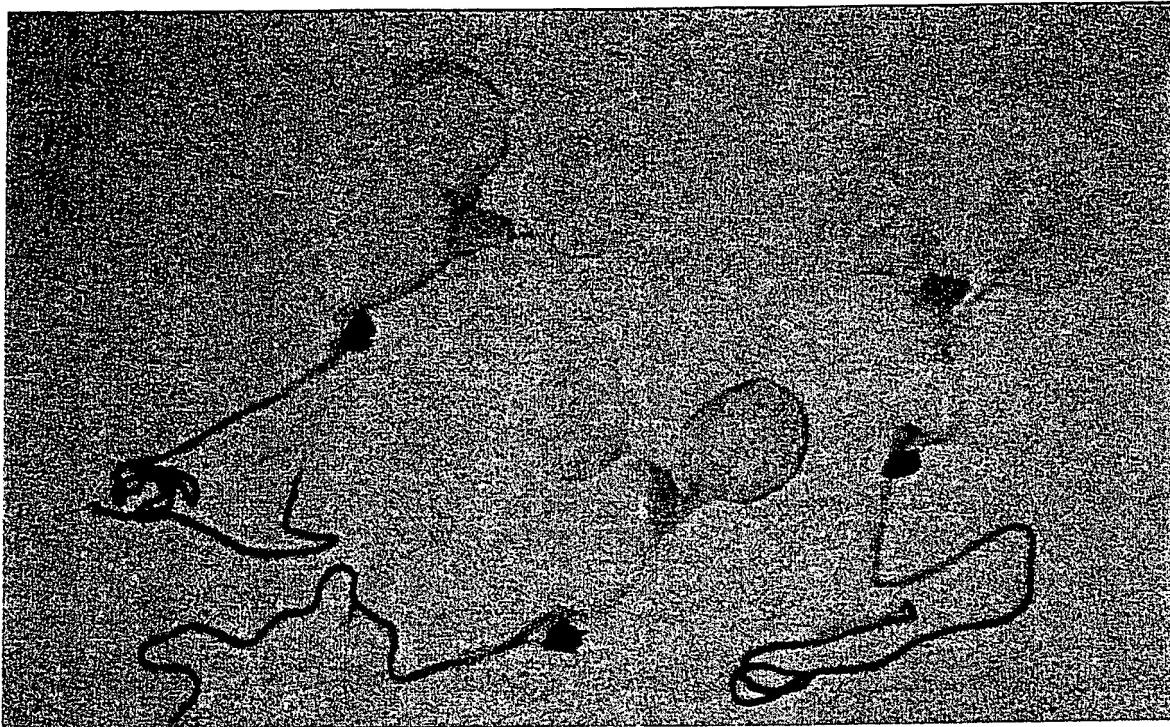


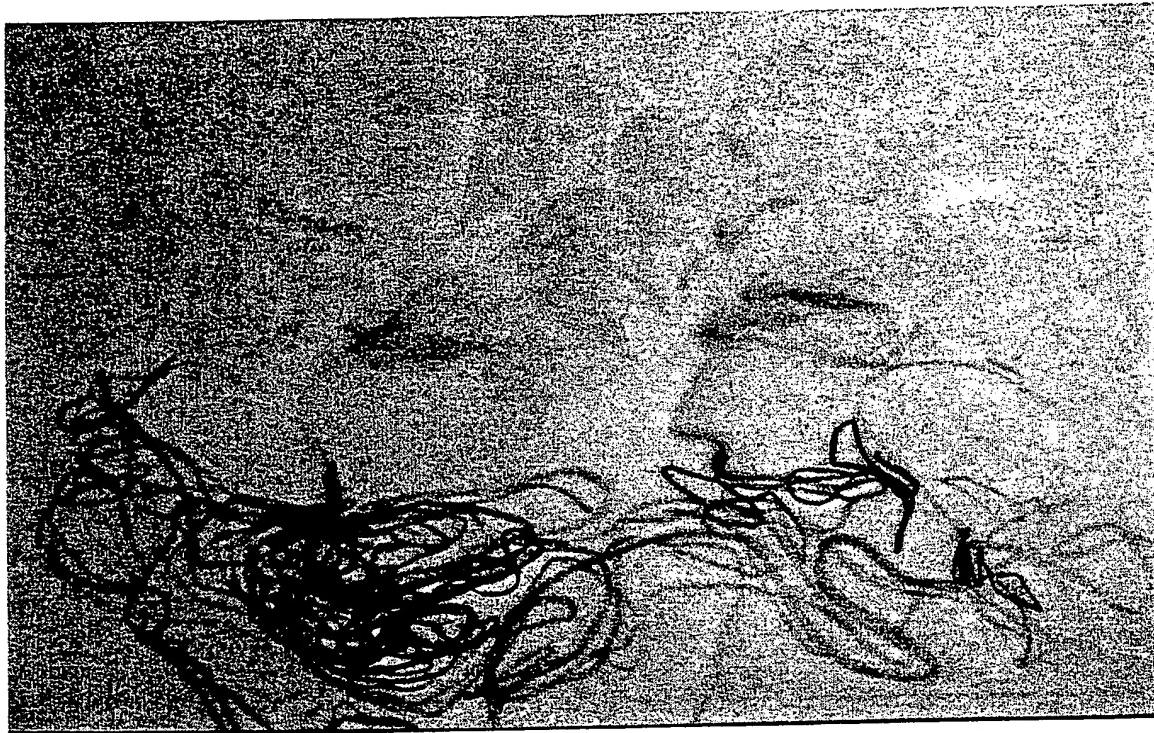
PBin19-insert2

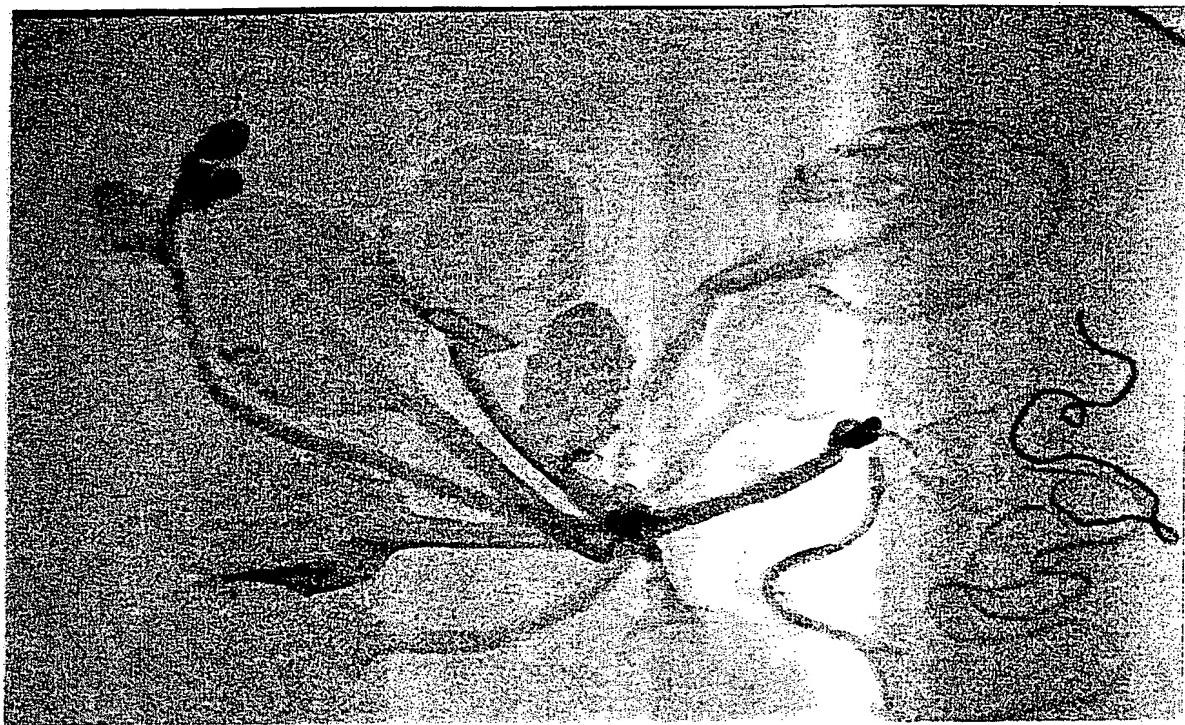
16.00 Kb

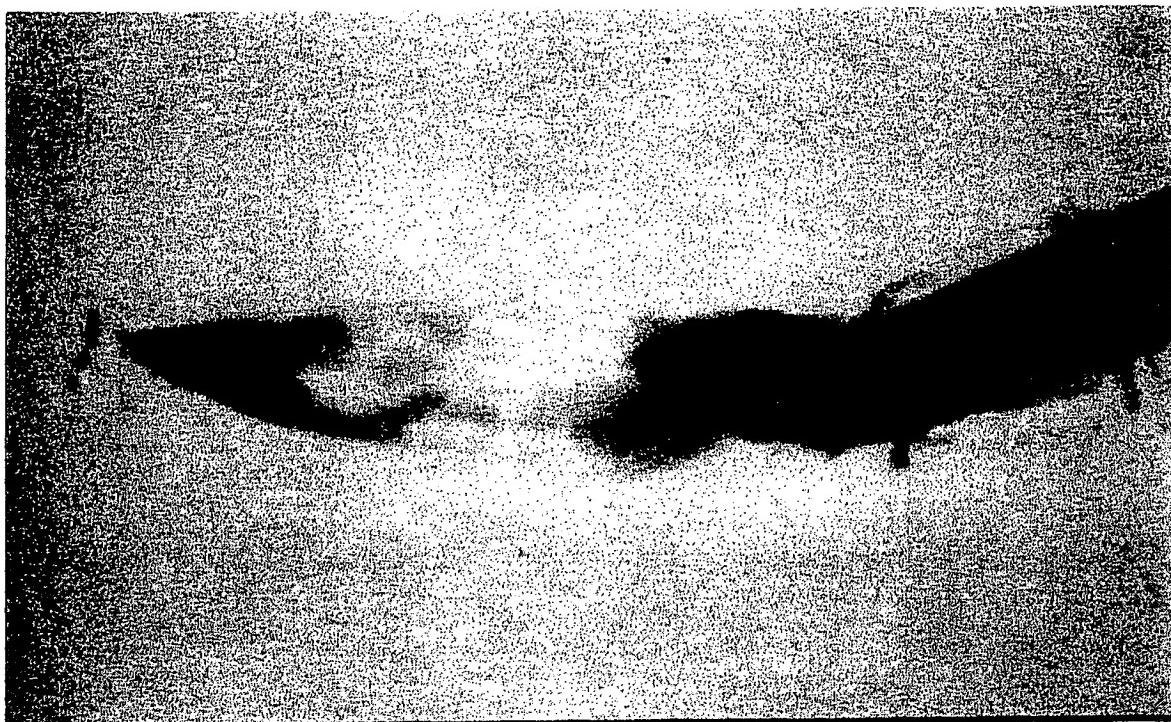
Figure 2 (b)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

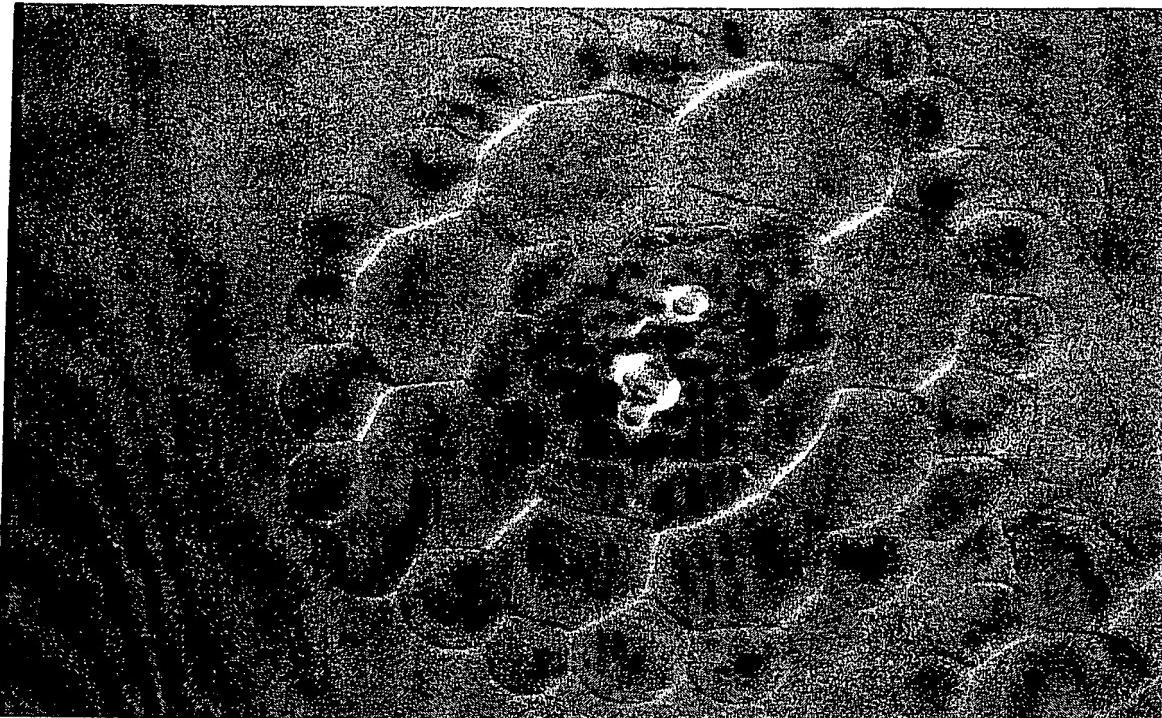








FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)



FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)

13/22

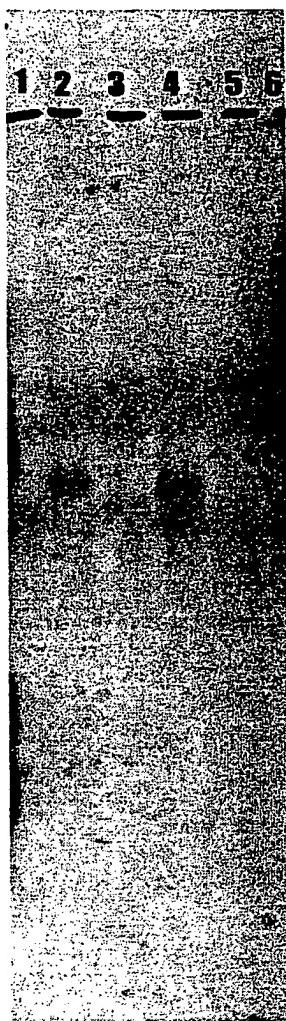


Figure 5

FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)

14/22

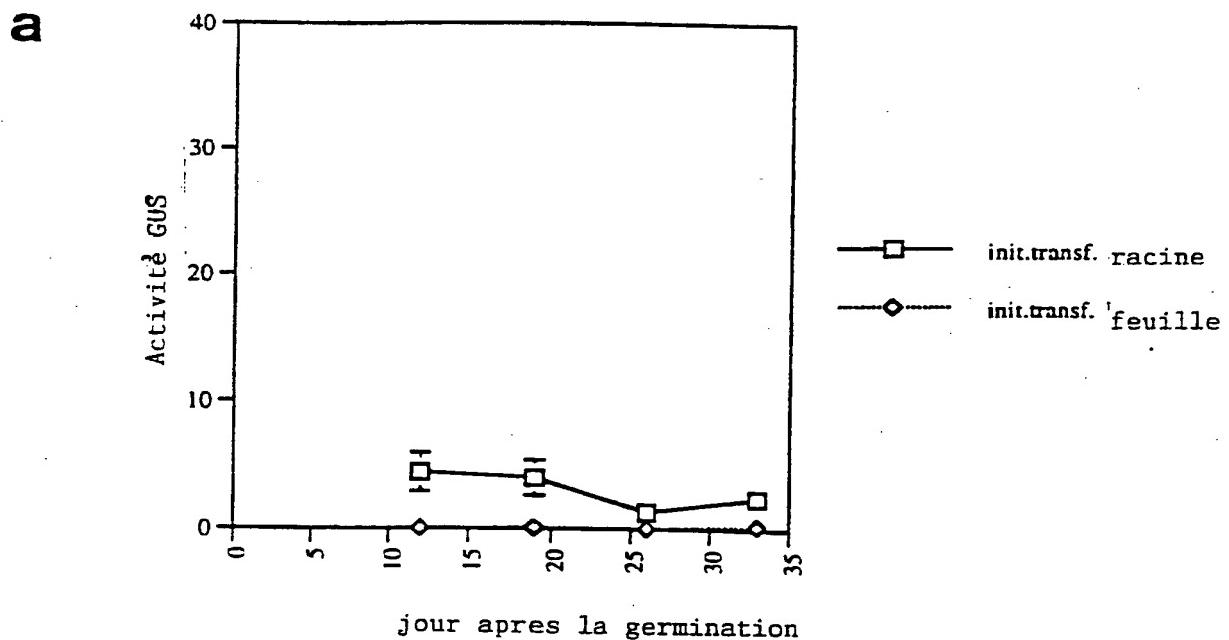


Figure 6(a)

15/22

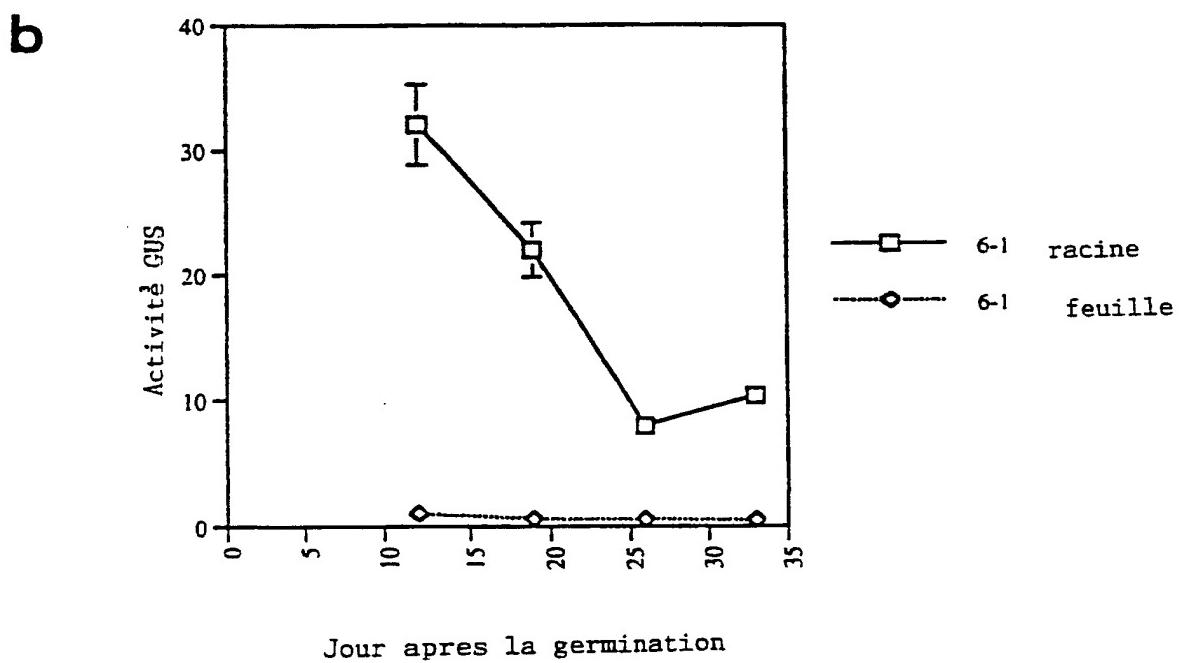
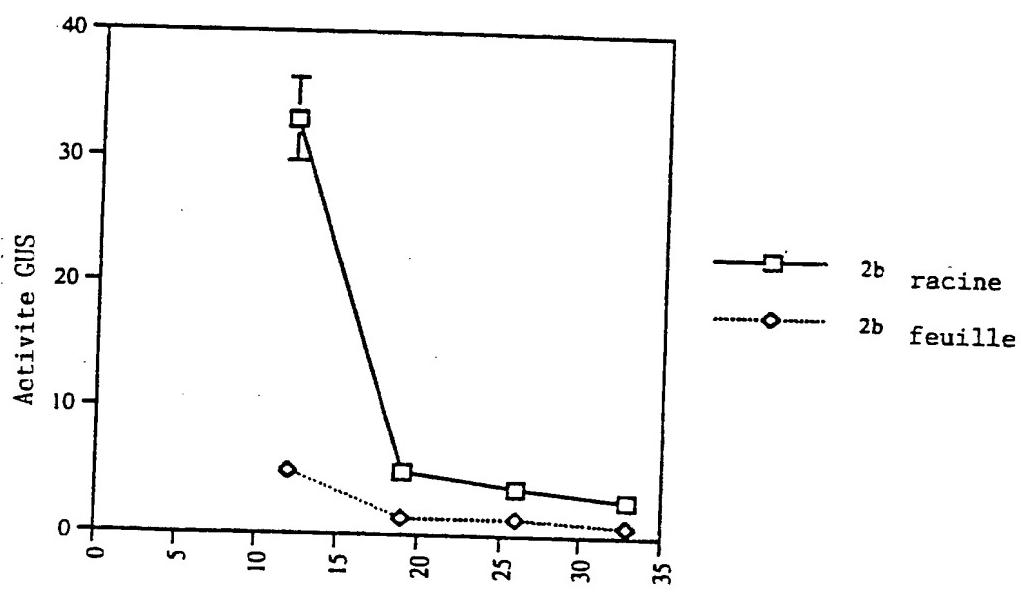


figure 6(b)

16/22

C

Jour apres la germination

Figure 6(c)

17/22

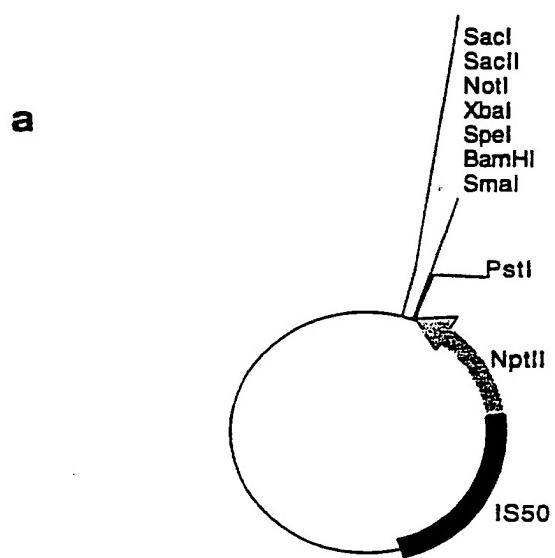


Figure 7(a)

18/22

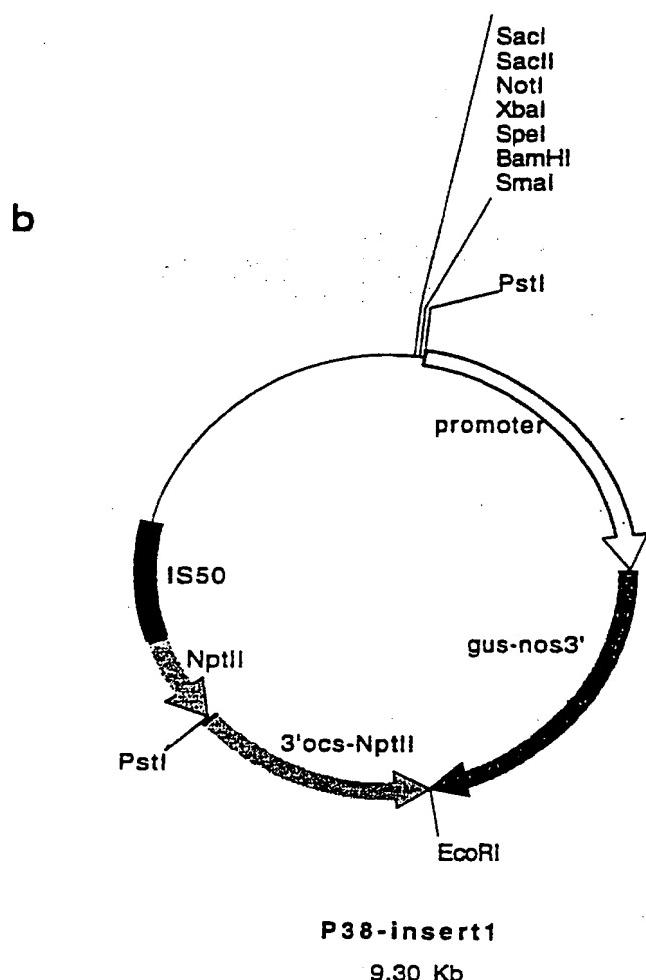


Figure 7(b)

19/22

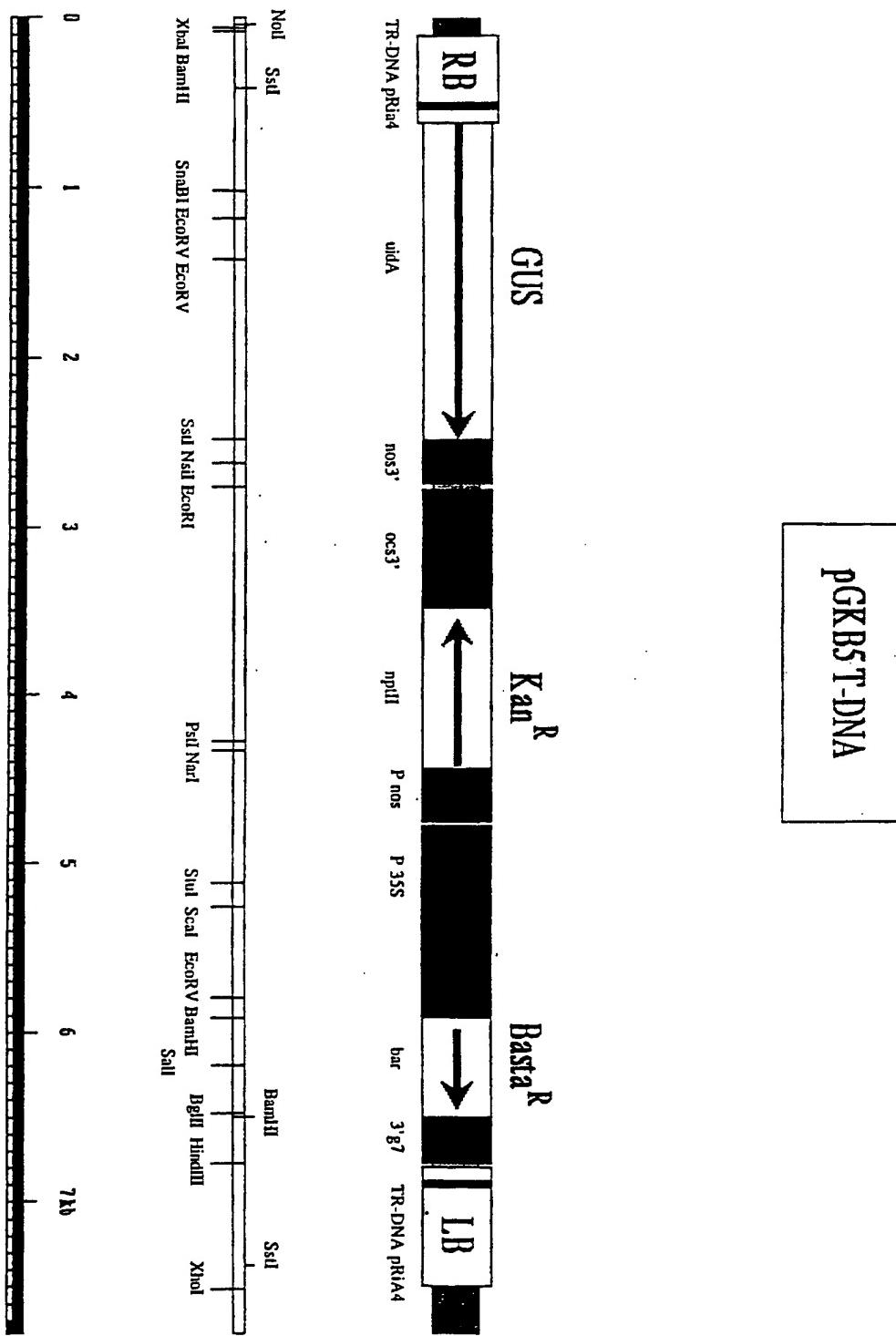


Figure 8

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

1 GGAAACAGCT ATGACCATGA TTACGCCAAG CTCGGAATTAA ACCCTCACTA AAGGGAAACAA
 61 AAGCTGGAGC TCCACCGCGG TGGCGGCCGC TCTAGAGGAT CCCCCCACAG ACAGCTCCGT
 121 AGCCCCTCGTT CTCCCTTGGAG TTCTTCGGGA AATGGATCTT TCGATTCGGC ATGATGTC
 181 TCTTATCTGC TTTGACGAGC CCGACTGGAC ATCCGCTATA ACGCCGCCAT TGACCGTGAT
 241 TTCCGCAACCT GTCAGGGATC TCGGACGGC TGCCACAGAA GACCTGATCG CCCGCTTAAA
 301 GGGCGAGACT TCAGCCCCCAC CCAAGGAAAC TCTTCTCCCG CGGGCTTCA TAGAGCGCGG
 361 TTCCCGTAAGC GTTCTTCGG AAGGTGGGG TTGCACTACCG AACTCCGAA ACGTCCGGA
 421 CTGAGCTCCC GAGGGCGGTT GACAAGATGC CACGAAGGGA ATGGAAGACA GCGGATATTG
 481 CAATTGTCCTT CGTGGACTGC TTTCGGAGC TAAGGGCAA GCCATCATCA CGGGCGTCT
 541 AAACAAACAT ACCTCCACAC AAATTATCT ACCTGACCC AAGATATATC CTGTCACACG
 601 ATTTATTAAA CGCTGCACTT GGGGTGGTCA G/TCCCTTATG TTACGTCCTG TAGAAACCCC
 661 AACCCGTGAA ATCAAAAAAC TCGACGGCCT GTGGGCATTC AGTCTGGATC GCGAAAACGTG
 721 TGGAAATTGAT CAGCGTTGGT GGGAAAGCGC GTTACAAGAA AGCCGGCAA TTGCTGTGCC
 781 AGGCAGTTTT AACGATCAGT TCGCCGATGC AGATATTCTG AATTATGCGG GCAACGTC
 841 GTATCAGCGC GAAAGTCTTAA TACCGGAAAGG TTGGGCAAGGC CAGCGTATCG TGCTGCGTT
 901 CGATCGGCTC ACTCATTACG GCAAAGTGTG GCTCAATAAT CAGGAAGTGA TGGAGCATCA
 961 GGGCGGCTAT ACGCCATTIG AAGCCGATGT CACGGCGTGT GTTATTGCGG GGAAAAGTGT
 1021 ACGTATCACC GTTGTGTGAA ACAACGAACT GAACTGGCAG ACTATCCCCTC CGGGAATGGT
 1081 GATTACCGAC GAAAACGGCA AGAAAAAGCA GTCTTACTTC CATGATTCTT TTAACTATGC
 1141 CGGAATCCAT CGCAGCGTAA TGCTCTACAC CACGCCAAC ACCTGGGTGG ACGATATCAC
 1201 CGTGGTGACG CATGTCGCGC AAGACTGTAA CCACCGCTCT GTGACTGGC AGGTGGTGGC
 1261 CAATGGTGTAT GTCAAGCGTIG AACTGCCTGA TGCGGATCAA CAGGTGGTTG CAACTGGACA
 1321 AGGCACTAGC GGGACTTTGC AAGTGGTGA TCCGCACCTC TGGCAACCCG GTGAAGGTTA
 1381 TCTCTATGAA CTGTCGCTGA CAGCCAAAAG CCAGACAGAG TGTATATCT ACCCGCTTCG
 1441 CGTGGCATC CGGTCAGTGG CAGTGAAGGG CCAACAGTTTCTGATTAACC ACAAACCGTT
 1501 CTACTTTACT GGCTTGGTC GTCATGAAGA TGCGGACTTA CGTGGCAAG GATTCGATAA
 1561 CGTGCTGATG GTGCACGACC ACGCATTAAAT GGACTGGATT GGGGCGCAACT CCTACCGTAC
 1621 CTCGCAATTAC CCTTACGCTG AAGAGATGCT CGACTGGGCA GATGAACATG GCATCGTGGT
 1681 GATTGATGAA ACTGCTGCTG TCGGCTTTAA CCTCTCTTTA GGCATTGGTT TCGAAGCGGG
 1741 CAACAAGCCG AAAGAACGTC ACAGCGAAGA GCGAGTCAC GGGGAAACCTC AGCAAGCGCA
 1801 CTTACAGCGC ATTAAAGAGC TGATAGCGC TGACAAAAAC CACCCAAGCG TGGTGTGATG
 1861 GAGTATTGCC AACGAACCGG ATACCCGTC GCAAGTGCAC GGGAAATTCTT CGCCACTGGC
 1921 GGAAGCAACG CGTAAACTCG ACCCGACCGC TCCGATCACC TCGTCAATG TAATGTTCTG
 1981 CGACGCTCAC ACCGATACCA TCAGCGATCT TTGATGTG CTGTGCGTGA ACCGTTATTA
 2041 CGGATGGTAT GTCCAAAGCG GCGATTGGA AACGGCAGAG AAGGTACTGG AAAAGAAACT
 2101 TCTGGCTGG CAGGAGAAAC TGCATCAGCC GATTATCATC ACCGAATACG GCGTGGATAC
 2161 GTTAGCCGGG CTGCACTCAA TGTACACCAGA CATGTGGAGT GAAGAGTATC AGTGTGCATG
 2221 GCTGGATATG TATCACCGCG TCTTGTATCG CGTCAGCGCC GTGTCGGTG AACAGGTATG
 2281 GAAATTGCGC GAAATTGCGA CCTCGCAAGG CATATTGCGC TTGGCGGTA ACAAGAAAGG
 2341 GATCTCACT CGCGACCGCA AACCGAAGTC GGGGGCTTT CTGTCGAAA AACGCTGGAC
 2401 TGGCATGAAAC TTGGTGAA AACCGCAGCA GGGAGGCAA CAATGAATCA ACAACTCTCC
 2461 TGGCGCACCA TCGTCGGCTA CAGCCTCGGT GGGGAATTGA GCTCGATCGT TCAAACATT
 2521 GGCAATAAAAG TTCTTAAGA TTGAATCTG TTGCGGGTCT TCGATGATT ATCATATAAT
 2581 TTCTGGTGA TTACGTTAAG CATGTAATAA TTAAACATGTA ATGATGACG TTATTATGA
 2641 GATGGGTTTT TATGATTAGA GTCCCGCAAT TATACATTAA ATACGCGATA GAAAACAAAA
 2701 TATAGCGCGC AAACCTAGGAT AAATTATCGC GCGGGGTGTC ATCTATGTTA CTAGATCGAA
 2761 TT/CATCGAG GGGATCGAGC CCCTGCTGAG CCTCGACATG TTGTCGCAAATTCGCCC
 2821 GACCCGCCCA ACGATTGTC GTCACTGTC AGGTTTGACC TGCACTTCAT TTGGGGCCCA
 2881 CATAACCAA AAAAATCTG CATAATTCTC GGGCAGCAA GTCGGTTACCGGGCGCGT
 2941 GCTGGACCGG GTGAATGGT GCCCCTGAACT TTGGTAGAG CGGACGGCCA ATACTCAACT
 3001 TCAAGGAATC TCACCCATGC GCGCCGGCGG GGAACCGGAG TTCCCTTCAG TGAACGTTAT
 3061 TAGTTGCGCG CTCGGTGTGT CGTAGATACT AGCCCTGGG GCCTTTGAA ATTGAAATAA
 3121 GATTATGTA ATCAGCTTT TAGGTTGAC CGGTTCTGCC GCTTTTTTA AAATTGGATT
 3181 TGTAATAAA AAACGCAATT GTTGTGTT TGTGGCTCT ATCATAGATG TCGCTATAAAA
 3241 CCTATTGAGC ACAATATATT GTTTCTATT TAATATTGTA CATATAAGTA GTAGGGTACA
 3301 ATCAGTAAAT TGAACGGAGA ATATTATTC TAAAAATACG ATAGTAACGG GTGATATATT
 3361 CATTAGAATG AACCGAAACC GGCGGTAAGG ATCTGAGCTA CACATGCTCA GGTTTTAC
 3421 AACGTGCACA ACAGAATTGA AAGCAAATAT CATGCGATCA TAGGCGTCTC GCATATCTCA
 3481 TTAAAGCAGG GGGTGGCGA AGAACTCCAG CATGAGATCC CGCGCTGGA GGATCATCCA
 3541 GCGGGCGTCC CGGAAAACGA TTCCGAGGCC CAACCTTCA TAGAAGGGGG CGGTGGAATC
 3601 GAAATCTCGT GATGGCAGGT TGGCGTCGC TTGGCGGTCTT ATTCGAACC CCAGAGTCCC

Figure 9(1)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

21/22

3661 GCTCAGAAGA ACTCGTCAAG AAGGGCATAG AAGGGGATGC GCTCCGAATC GGGAGCGGCC
 3721 ATACCGTAAA GCACGAGGAA GCGGTGAGCC CATTGCGGCC CAAGCTCTTC AGCAATATCA
 3781 CGGGTAGCCA ACGCTATGTC CTGATAGCGG TCCGCCACAC CCAGCCGGCC ACAGTCGATG
 3841 AATCCAGAAA AGCGGCCATT TTCCACCATG ATATTGGCA ACCAGGCATC GCCATGGGTC
 3901 ACGACGAGAT CCTCGCCGTC GGGCATGCGC GCCTTGAGCC TGCGAACAG TTGGCTGGC
 3961 GCGAGCCCT GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCTGATCGA CAAGACCGC TTCCATCCGA
 4021 GTACGTGCTC GCTCGATGCG ATGTTTCGCT TTGTTGGCTGA ATGGGCAGGT AGCCGGATCA
 4081 AGCGTATGCA GCGCCGCAT TGCATCAGCC ATGATGGATA CTITCTCGGC AGGAGCAAGG
 4141 TGAGATGACA GGAGATCTG CCCCCGGCACT TCCGCCAATA GCAGCCAGTC CCTTCCCCT
 4201 TCAGTGACAA CGTCGAGCAC AGCTGCGCAA GGAACGCCCG TCGTGGCCAG CCACGATAGC
 4261 CGCGCTGCTT CGTCCCTGAG TTCAATTGAG GCACCGGACA GGTGGTCTT GACAAAAAGA
 4321 ACCGGGCGCC CCTGCGCTGA CAGCCGGAC ACGGCGGCAT CAGAGCAGCC GATTGTCGT
 4381 TGTGCCAGT CATAGCCGAA TAGCCCTCTCC ACCCAAGCG CCGGAGAAC TCGGTGCAAT
 4441 CCATCTTGT CAATCCACAT GATCATGGGC CGGATCTTTC ATTGAGAGTG AATATGAGAC
 4501 TCTAATTGGA TACCGAGGG AATTATGGGA ACGTCACTGG AGCATTTCG ACAAGAAATA
 4561 TTGCTTAGCT GATAGTGACC TTAGGGCAGT TTGAACCGG CAATAATGGT TTCTGACGTA
 4621 TGTGCTTAGC TCATTAAACT CCAGAAACCC GCGGCTGAGT GGCTCCCTCA ATCGTIGCGG
 4681 TTCTGTCAGT TCCAAACGTA AAACCCCTTG TCCCGCGTCA TCGCGGGGG TCATAACGTG
 4741 ACTCCCTTAA TTCTCCGTC ATGATCTGT TTCTTGTTG AAATTGTTA CCGCTCACAA
 4801 TTCCACACAT TATACGAGCC GGAAGCATAA AGTGTAAAGC CTGGGGTGCCT TAATGAGTGA
 4861 GCTAACTCAC ATTAATTGCG TTGCGCTCAC TGCCCGCTTT CCAGTGGGA AACCTGTCGT
 4921 GCCAGCTGCA TTAATGAATC GGAATTGACG GATCTCTTT GCGGAGAGGA TCACCATGGA
 4981 CGACTTCTC TATCTCTTAC ATCTAGGAAG AAAGTTGACG GGAGAACGGT AGCATAACCAT
 5041 GTTCACCAAC GATAATGAGA AGATTAGCCT TTCAATTTC AGAAAGAATG CTGACCCACA
 5101 GATGGTTAGA GAGGCCCTAG CGGCAGGTCT CATCAAGACG ATCTACCCGA GTAATAATCT
 5161 CCAGGAGATC AAATACCTTC CCAAGAAGGT TAAAGATGCA GTCAAAAGAT TCAGGACTAA
 5221 CTGCACTCAAG AACACAGAGA AAGATATAATT TCTCAAGATC AGAAGTACTA TTCCAGTATG
 5281 GACGATTCAA GGCTTGCCTC ATAACCAAG GCAAGTAATA GAGATTGGAG TCTCTAAGAA
 5341 AGTAGTTCTT ACTGAATCAAG AGGCGATGGA GTCAAAATT CAGATCGAGG ATCTAACAGA
 5401 ACTCGCCGTG AAGACTGGCG AACAGTTCAT ACAGAGTCTT TTACGACTCA ATGACAAGAA
 5461 GAAATCTTC GTCAACATGG TGGAGCACGA CACTCTCGTC TACTCCAAGA ATATCAAAGA
 5521 TACAGTCTCA GAAGACCAAA GGGCTATTGA GACTTTTCAA CAAAGGGTAA TATCGGGAAA
 5581 CCTCCCTCGGA TTCCATTGCC CAGCTATCTG TCACTTCATC AAAAGGACAG TAGAAAAGGA
 5641 AGGTGGCACC TACAAATGCC ATCATTGCGA TAAAGGAAAG GCTATCGTTC AAGATGCCCTC
 5701 TGCGGACAGT GGTCCCAAAG ATGGACCCCC ACCCACGAGG AGCATCGTGG AAAAGAAGA
 5761 CGTTCCAACC ACGTCTTCA AGCAAGTGGG TTGATGTTGAT ATCTCCACTG ACCTAAGGGG
 5821 TGACGCACAA TCCCACATC CTTCGCAAGA CCCCTCTCTT ATATAAGGA GTTCATTTCA
 5881 TTGGAGGAGG ACACGCTGAA ATCACAGTC TCTCTCTACA AATCGATCC ATGAGCCAG
 5941 AACGACGCC CGCCGACATC CGCCGTGCCA CCGAGGCGGA CATGCCGGCG GTCTGCACCA
 6001 TCGTCAACCA CTACATCGAG ACAAGCACGG TCAACTTCCG TACCGAGCCG CAGGAACCGC
 6061 AGGAGTGGAC GGACGACCTC GTCCGCTCTGC GGGAGCGCTA TCCCTGGCTC GTCGCCGAGG
 6121 TGGACGGCGA GGTGCGCGGC ATCGCCTACG CGGGCCCCCTG GAAGGCACGC ACGCCTACG
 6181 ACTGGACGGC CGAGTCGACC GTGTAACGCTCT CCCCCCGCCCA CGAGCGACG GGACTGGGCT
 6241 CCACGCTCTA CACCCACCTG CTGAAGCTC TGGAGGACCA GGGCTCTCAAG AGCGTGGTCTG
 6301 CTGTCATCGG GCTGCCAAC GACCCGAGCG TGCGCATGCA CGAGGCCTC GGATATGCC
 6361 CCCGGGGCAT GCTCGGGCG GCGGCTTCA AGCACGGGAA CTGGCATGAC GTGGGTTCT
 6421 GGCAGCTGGA TTTCAGGCTG CCGGTACCCGC CCCGTCGGT CTCGGCGTC ACCGAGATCT
 6481 GATCTCACGC GTCTAGGATC CGATGGATCC CCCGATGAGC TAAGCTAGCT ATATCATCAA
 6541 TTATGTATT ACACATAATA TCGCACTCAG TCTTCTAC TACGGAAATGT ACCAGCTGAT
 6601 ATAATCAGTT ATTGAAATAT TTCTGAATT AAACCTGAT CAATAAATT ATGTTTTGCT
 6661 TTGGACTATA ATACCTGACT TTGTTATTAA TTAAACTAT TCTTAAAT TCTTAACTAT ATTTCTTCT
 6721 AGATGGGAAT TAACATCTAC AAATTGCTT TCTTAAATGCA CCAATGATCAT CAAGCTTATC
 6781 GATACCGTCG GCTATTGGTA ATAGGACACT GGGATTGCTC TTGGACAACT TCTCTCTCA
 6841 TCTAACGCTA GACAACCCCT AACTGGAAAC GGGCCGGACT CCAGGGCGTG TGCCAGGTGC
 6901 CCACGGAATA GTTTGGCCA GACCCCTGAA AATCCGATTC AGTACAATCG ATTCGCCCCA
 6961 TTTTACGTT GGCATATATC CTGCCAAACA GCCAACAAAG CGCGTGGGGT GAATAGGAAA
 7021 GCGTTTGAGT TGCTTGTCTA TATGTCGACG AATGATATAC CATGTCAGAA CAGCAATCCG
 7081 TCGTACGAGC CGCCAAACAT TGGCTGTCGT TTAATGCA ACGGAAATGGC GCGTCGGTGG GTGGAATACA
 7141 ATGGGGCGGA AAGCATTATC TCAAAATCAA CATCGTCGA AAGTGGCAG CAGGCCACG
 7201 CCGACATAGA GCGCTAAGT TCTGCACTGT TGCGTGTGA AAGAATAATC GAAGAGAGCG
 7261 GCTGTTGGCT CTTGCTCTT CAGCGTGAAA TGCGTGTGA AAGAATAATC GAAGAGAGCG
 7321 TCCGCTCGAC ACCCTCAATT ATGCGGATT GATCGATGAA CTGATCGAGC TCTGAAATCG
 7381 AAGGGGCTTC GATAATCGCA ATCAAATCAA AAGTGGCACT CACAGAATGAA AGACCGATAA
 7441 CGGCCGTGAC CTTCAGGAGG GAGGCCGTCA CCTGTGAAAG CGCCTTCGTA ATGGTGTATC
 7501 GAATATGGGC TCGAACCAAG CTGAGACCT CGAGGGGGGG CCCGGTACCC AATTGCCCC
 7561 ATAGTGAGTC GTATTACAAT TCACTGGCCG TCCTTAC

Figure 9(2)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

22/22

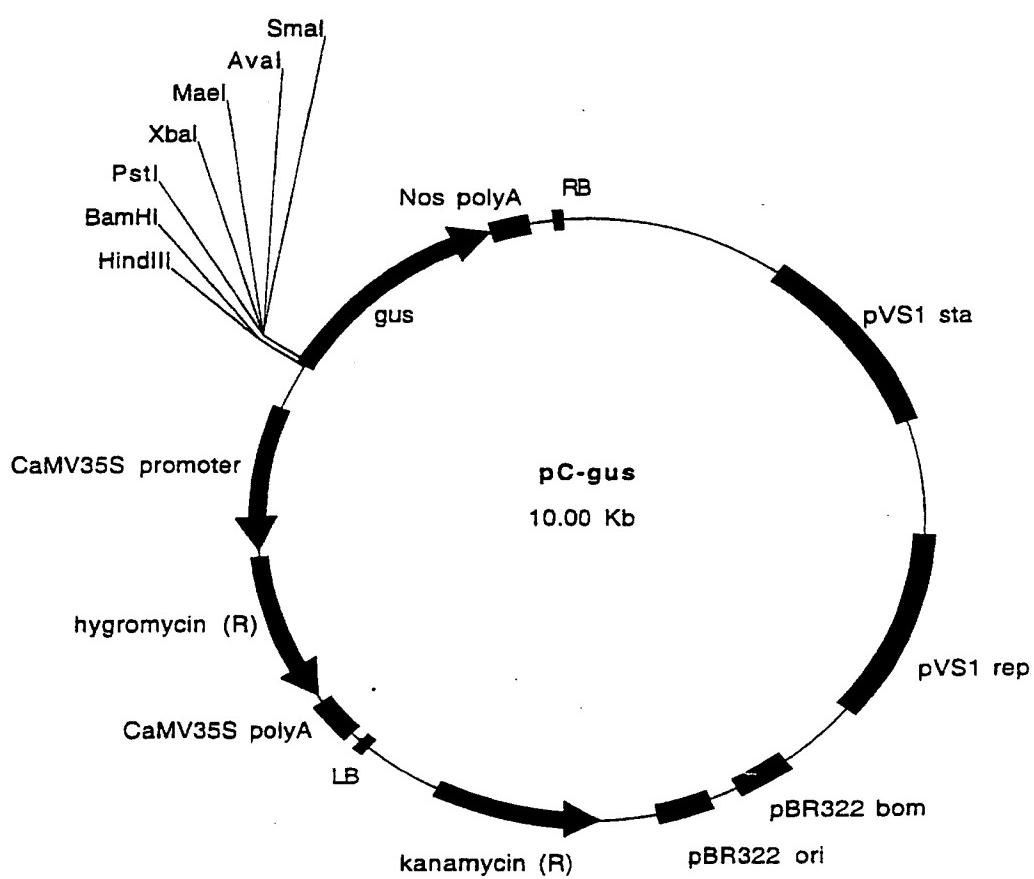


FIGURE 10

LISTE DE SEQUENCES

<110> Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)

<120> Promoteur s'exprimant spécifiquement dans les cellules de racines de plantes, vecteurs et cellules hôtes recombinantes comprenant un tel promoteur et plantes transgéniques obtenues

<130> INRA Promoteur Végétal Racine

<140>

<141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2149

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

gtcgaattgt gataatattgt aagcaatctg aaaagaataa gtgggatata taaaacaacccg 60
gcgaaagtac aagttctacc ttttttggc atggaaccat gtttttagga ttactttgt 120
aattcctgaa tcatttcattt cttgaattga tatttacatt tttatcaaaa aaaaagtaca 180
agttctacca aagcacagga gttaaacaac ttgtgtgtca aatgctaatt taaaggctaa 240
tcattatgatt tccctttct tcacgatata tactgatatt gatatgcacc catttggtt 300
tcattaactt cccactctat acatcagtat ctcaaagtgc aataacaata tccataagaa 360
gtggtatatt gtgaaaaaaaaa aaaaaaaaaaag tggtatactg gtatatacaa taccacggc 420
tcgaattgcc tcaacaattt ctaggagaaaa atggacgtgt ctctttggtt ttatttatt 480
cttaataaca tactctatat tttaaacact tcgatgtctc gcttaaattt cgaatgtgcc 540
taaatttctc taatcataaa tcgtaaagaa aattcgtcga agccacaggg acatgcata 600
ggcacgtagt tacccctaaa accatcaaaa atatattaat agaaaaggaa acttcctaaa 660

2

agaacaat tt aataaaagtgg ataaaaaaaaag ataagaaggt aggcagaaga aaacgtatgg 720
 ccgcgactcg taacaaggga cgtcccgacc actgcggaga cggcgagacg ctgactgatt 780
 ttttctttt ctttcctaa agaacgttgt ttctgtctta caagggtcaa aaccatatcc 840
 aattgttctg cctattatta tataactaaa gatcccctct tgtgctttgt ctttattctg 900
 gatataataat ctaactaaa tttagttctaa aatatataatg tcctacctat gtttctactg 960
 acctcagtcc ctagtttagct atatggacat atgtgaaaat gacgccccaaa atttgaagag 1020
 ttccctttcc tgcaactaac tcttatctta ctcattgagc tatgttaaat attgaatgtt 1080
 ggcactctcg tattaaatat gccagttgca cctagataaa aaaacatgt agacatttag 1140
 tttaaaactt gaaatgttat ttgaactctt tggattacgt ggattgttgt atggattaaa 1200
 ttttgaagat atttataatat tgaagatgtt tatataatatt agagtttata tagcagaaaa 1260
 tattgtatgtt gatgttgc tttttagttt actctttttt gttgcgttgt ctcttcct 1320
 catcctccta tgaagaaaaa tccaaatagt ttaaggaaat ttttgcgtaa ttcatagtct 1380
 tttcgtaac cacagttcta tgttagctatc gtcatcatat tcctcttgc aacaacaaaa 1440
 aagatcgttt ttgtaaaatt tagtagggca ctaaagtctgt catttgcgtt cctgtcgaaa 1500
 tctagcgttc tgtcatccac aaataagttt tttgattcga gcttccaaga ttataatctt 1560
 ttttagatgg gtcatgaaga tttctaactt cgtatacgtatc tttatccata taatttctaa 1620
 catatacgtc ttgttttgg taggctctgc gtctttgag accacccct tgctaatgtt 1680
 ttgttgccacc ttagacaatc cataataacgt tacgtgagtc gaagttgcac caaaatggtc 1740
 caaatataat ttaaatttgg ccacaaaaaca acatttaca aacaaattca acaaacatgc 1800
 atcgttcaa attttatctt ttcaatggcg ttatgttgc attgtaaata ttctgtttaa 1860
 ctcactgacg aattttttaa ttttcaaag aagaacattt ttgatataaa taacattta 1920
 tggAACCCACC ggttaagctc gatgatttt agtttttagtt ttgtcggttt gtgaaatcat 1980
 taacgaccta catttgcattc ctcattactt taataattag gaatcaaaca tgatgattaa 2040
 gttcaccaaa gacgtctctt atggctatca agagtcagac gcaaggatga ccgggggtcat 2100
 taagacgtct tatattcaac cattactcca ctaattgcttta attaatcag 2149

<210> 2

<211> 4280

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence

artificielle:Construction promoteur + séquence

codante du gène gus

<400> 2

gtcgaattgt gatataattgt aagcaatctg aaaagaataa gtgggatata taaacaaccg 60
gcgaaagtac aagttctacc ttttttggc atggaaccat gtttttagga tttactttgt 120
aattcctgaa tccttcattt cttgaattga tatttacatt tttatcaaaa aaaaagtaca 180
agttctacca aagcacagga gttaaacaac ttgtgtgtca aatgctaatt taaagcctaa 240
tccttatgatt tccctttct tcacgatata tactgatatt gatatgcacc catttgggt 300
tcattaactt cccactctat acatcagtat ctcaaagtcg aataacaata tccataagaa 360
gtggtatatt gtgaaaaaaaaaaaaaaag tggtatactg gtatatacaa taccacggc 420
tcgaattgcc tcaacaattt ctaggagaaa atggacgtgt ctctttgggt ttattttattt 480
cttaataaca tactctatat tttaaacact tcgatgtctc gcttaaattt cgaatgtgcc 540
taaatttctc taatcataaaa tcgtaaagaa aattcgtcga agccacaggg acatgcata 600
ggcacgttgt tacctttaaa accatcaaaa atatattaat agaaaaggaa acttcctaaa 660
agaacaattt aataaagtgg ataaaaaaaaag ataagaaggt aggcagaaga aaacgtatgg 720
ccgcgactcg taacaaggga cgtccccgacc actgcggaga cggcgagacg ctgactgatt 780
ttttctttt ctttcctaa agaacgttgt ttcgtgctt caagggtcaa aaccatatcc 840
aattgttctg cctattatta tataactaaa gatcccctct tgtgcttgc ttatttttgt 900
gatataataat ctaacttaaa tttagttctaa aatataatatg tcctacctat gtttctactg 960
acctcagtcc ctatgttgtt atatggacat atgtaaaaat gacgcggaaa atttgaagag 1020
ttcctcttcc tgcaactaac tcttatctt ctcattgagc tatgttaaat attgaatgtt 1080
ggcactctcg tattaaatat gccagttgca cctagataaaa aaaacatgat agacatttag 1140
tttaaaactt gaaatgttat ttgaactctt tggattacgt ggattgttgt atggattaaa 1200
ttttgaagat atttatataat tgaagatgtt tatataatatt agagttata tagcagaaaa 1260
tattgatgtt gatgttgtcc ttttgtagtt actctttttt gttgcgttgt cttttctcct 1320
catcctccta tgaagaaaaa tccaaatagt ttaaggaaat ttttgttcaa ttcatagtct 1380
tttcgttaac cacagttcta ttttagctatc gtcatcatat tcctcttgc aacaacaaaa 1440
aagatcgtt ttgtaaaatt tagtagggca ctaaagtctgt catttgggtgt cctgtcgaaa 1500
tctagcggtc tgcataccac aaataagttt tttgattcga gcttccaaga ttataatctt 1560
tttttagatgg gtcatacaga tttctaaactt cgtatacgtatc tttatccata taatttctaa 1620
catatacgcc ttgttttgg taggctctgc gtcattttgag accacccccc tgctaatgtt 1680
ttgttgtccacc ttagacaatc cataatacgt tacgtgagtc gaagttgcac caaaatggc 1740
caaataataat tttaaaatttgg ccacaaaaca acattttaca aacaaattca acaaacatgc 1800
atcgtttcaa attttatataa ttcaatggcg ttatgttgttcc attgtaaata ttctgtttaa 1860
ctcactgacg aattttttaa ttttcaaag aagaacattt ttgatataaaa taacatttta 1920

tggaaaccacc ggttaagctc gatgattttg agtttttagtt ttgtcgaaaaatcat 1980
taacgaccta catttgcattcc ctcattactt taataattag gaatcaaaca tgatgattaa 2040
gttcaccaaa gacgtctctt atggcttatta agagtcagac gcaaggatga ccggggatcat 2100
taagacgtct tatattcaac cattactcca ctaattgcta attaatcagt cccttatgtt 2160
acgtcctgtt gaaaccccaa cccgtgaaat caaaaaactc gacggcctgt gggcattcag 2220
tctggatcgc gaaaactgtg gaattgatca gcgttggtgg gaaagcgcgt tacaagaaaag 2280
ccgggcaatt gctgtgccag gcagttttaa cgatcagttc gccgatgcag atattcgtaa 2340
ttatgcgggc aacgtcttgtt atcagcgcga agtctttata ccgaaagggtt gggcaggcca 2400
gcgtatcgtg ctgcgtttcg atgcggcac tcattacggc aaagtgtggg tcaataatca 2460
ggaagtgtatg gagcatcagg gcggctatac gccatttga ggcgtatgtca cgccgtatgt 2520
tattgcccggg aaaagtgtac gtatcaccgt ttgtgtgaac aacgaactga actggcagac 2580
tatccccccg ggaatggtga ttaccgacga aaacggcaag aaaaagcagt cttacttcca 2640
tgatttcttt aactatgcccgaatccatcg cagcgtaatg ctctacacca cgccgaacac 2700
ctgggtggac gatatcaccg tggtgacgca tgcgcgcaa gactgttaacc acgcgtctgt 2760
tgactggcag gtgggtggcca atgggtatgt cagcgttga ctgcgtgatg cggatcaaca 2820
ggtggttgca actggacaag gcactagcgg gactttgcaa gtggtaatc cgccacctctg 2880
gcaaccgggtt gaagggttac tctatgaact gtgcgtcaca gccaaaagcc agacagagtg 2940
tgatatctac ccgcttcgcg tcggcatccg gtcagtggca gtgaagggcc aacagtttct 3000
gattaaccac aaaccgttct actttactgg ctttggctgt catgaagatg cggacttacg 3060
tggcaaagga ttcgataacg tgctgatggc gcacgaccac gcattaatgg actggattgg 3120
ggccaaactcc taccgtaccc cgcattaccc ttacgctgaa gagatgctcg actgggcaga 3180
tgaacatggc atcgtgggtga ttgatgaaac tgctgctgtc ggcttttaacc tctctttagg 3240
cattggtttc gaagcgggca acaagccgaa agaactgtac agcgaagagg cagtcaacgg 3300
ggaaaactcag caagcgcact tacaggcgtat taaagagctg atagcgcgtg acaaaaaacca 3360
cccaaggcgtg gtgatgtgga gtattgccaa cgaaccggat acccgccgc aagtgcacgg 3420
gaatatttgc ccactggcgg aagcaacgcg taaactcgac ccgacgcgtc cgatcacctg 3480
cgtcaatgtatgttctgcg acgctcacac cgataccatc agcgatctct ttgatgtgct 3540
gtgcctgaac cgttattacg gatggatgtt ccaaagcggc gatttggaaa cggcagagaa 3600
ggtactggaa aaagaacttc tggcctggca ggagaaaactg catcagccga ttatcatcac 3660
cgaatacggc gtggatacgt tagccggctgc gcaactcaatg tacaccgaca tgtggagtga 3720
agagtatcag tgtgcattggc tggatatgtatgtc acccgccgtc tttgatgcgcg tcagcgcgt 3780
cgtcggtgaa caggtatggaa atttcgccga ttttgcgacc tcgcaaggca tattgcgcgt 3840
tggcggtaac aagaaaaggga tcttcactcg cgaccgcaaa ccgaagtcgg cggctttct 3900
gctgcaaaaaa cgctggactg gcatgaactt cggtaaaaaa ccgcagcagg gaggcaaaca 3960
atgaatcaac aactctcctg gcgaccatc gtcggctaca gcctcggtgg ggaattgagc 4020

5

tcgatcggttc aaacatttgg caataaaagtt tcttaagatt gaatcctgtt gccggcttg 4080
cgatgattat catataattt ctgttgaatt acgttaagca tgtaataatt aacatgtaat 4140
gcatgacgtt atttatgaga tgggtttta tgatttaggt cccgcaatta tacatttaat 4200
acgcgataga aaacaaaata tagcgcgaa actaggataa attatcgcgc gcggtgtcat 4260
ctatgttact agatcgaatt 4280

<210> 3

<211> 4413

<212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 3

aagatccaca gtgaataaaat aataagaacg gattcggtga tattgcaact atataatgaa 60
attgaataact ctgattcatc gctttgtatc aagatcgaat ctctaaaaac atatactcta 120
taataaaatat ctgcagtcga attgtatattt attgttaagca atctgaaaag aataagtggg 180
atataaaaac aaccggcgaa agtacaagtt ctacctttt ttggcatgga accatgtttt 240
taggattttac tttgttaattc ctgaatctt catttcttga attgatattt acatttttat 300
caaaaaaaaaa gtacaagttc taccaaagca caggagttaa acaacttgc tgtcaaatgc 360
taatttaaag cctaatactta tgatttccct tttcttcacg atatatactg atattgatat 420
gcacccattt gtttgcatt aacttcccac tctatacatc agtatctcaa agtcgaataa 480
caatatccat aagaagtggc atattgtgaa aaaaaaaaaa aaaagtggta tactggtata 540
tacaatacca cggtctcgaa ttgcctcaac aatttcttagg agaaaatgga cgtgtcttt 600
tggttttatt ttattcttaa taacatactc tatattttaa acacttcgtat gtctcgctta 660
aatttgcattt gtgcctaaat ttctcttaatc ataaatcgta aagaaaattt gtcgaagcca 720
cagggacatg catagggcac gtagttacct ttaaaaccat caaaaatata ttaatagaaa 780
aggaaaacttc ctAAAAGAAC aatttaataa agtggataaa AAAAGATAAG aaggtaggca 840
gaagaaaacg tatggccgcg actcgtaaca agggacgtcc cgaccactgc ggagacggcg 900
agacgctgac tgattttttc tttttctttt cctaaagaac gttgtttcgt gcttacaagg 960
gtcaaaaacca tatccaattt ttctgcctat tattatataa ctaaagatcc cctcttgc 1020
tttgtcttta ttctgtatatac ttaaatttagt tctaaaatata atatgtccta 1080
cctatgtttc tactgaccc agtccctagt tagctataatg gacatatgtg AAAATGACGC 1140
ccaaaatttg aagagttccct ttccctgcaa ctaactctta tcttactcat tgagctatgt 1200
taaatattga atgttggcac tctcgtatata aatatgccag ttgcacccatg ataaaaaaac 1260
atgatagaca tttagtttaa aacttggaaat gttatggaa ctctttggat tacgtggatt 1320

gttgttatgg aaaaatttt aagatattta tatatttgaag atgtttatat atatttagt 1380
ttatatacg gaaaatattg atgttagatgt tgcctttt tagttactct tttttgttgc 1440
gtagtcctt ctcctcatcc tcctatgaag aaaaatccaa atagtttaag gaaattttg 1500
tgtaattcat agtcttttc gtaaccacag ttctatgttag ctatcgtcat catattcctc 1560
tttgcaccaa caaaaaagat cgttttgtta aaatttagta gggcactaaa gtcgtcattt 1620
gttgcctgt cgaaatctag cgttctgtca tccacaaaata agttgttga ttgcagcttc 1680
caagattata atcttttta gatgggtcat gaagatttct aacttcgtat acgagtgtat 1740
ccatataatt tctaacatat acgtcttgc ttggtaggc tctgcgtctt ttgagaccac 1800
cccccttgcta atgtttgtt gcaccttaga caatccataa tacgttacgt gaqtcgaagt 1860
tgcaccaaaa tggtccaaat ataatttaaa ttggccaca aaacaacatt ttacaaacaa 1920
attcaacaaa catgcacatgt ttcaaatttt atttattcaa tggcgttatt tggtcattgt 1980
aaatattctg tttaactcac tgacgaattt tttaatttt caaagaagaa cattttgat 2040
ataaataaca ttatggaa ccaccggta agctcgatga tttagagttt tagtttgtc 2100
gttttgtaaa atcattaacg acctacattt gatccctcat tacttaata attaggaatc 2160
aaacatgatg attaagttca ccaaagacgt ctcttatggc tattaagagt cagacgcaag 2220
gatgaccggg gtcattaaaga cgtcttatcat tcaaccatta ctccactaat tgcttaattaa 2280
tcagattaaat ttgtttaata cgataatgtt ttgttattaa gtatctctca gccaacaggc 2340
aaaggataaa ttgttggatta ttcaaagatt tggggcttc caaaagcata gggatggct 2400
ccaaactacat tggaaatattt attatttaaa tctccattcc cattgccac agtcgttgg 2460
gttttatttt ttgttccaag tggagaatc aattataatt gtcgaaattt ctaaatccta 2520
cttggggaa aacaaaccca agcaaaatattt gtttagaaat gtacggaaat ctactataga 2580
attataactaa acatatacat atagtttgc tttaaaaattt aaaacaattt ttgtggca 2640
tttagtttagat attttaccag gggaaataag cagcactgtt catgcactct cttcttaattt 2700
actataacttt gaaagaactt atatgtcact gtattgccag ttgccactaa tatataaaaca 2760
acatttcact tggacatc gctgttaatg aagtttgaa cgaccctttt aacaactaat 2820
agggtaattt aaccactaaa ttgttccaag ttgttatttt gtcttaatgt gagacgtaat 2880
atctaatacg tcggcttaac ctaagagttt gttccgatca caaattttt agaagtacct 2940
ttcaataaaaa aattttgtt tataatttca ccgtttaag taaaaactta attaggagct 3000
attttctatt tgatgtgaat ttgaaaatgt ttccataaaaa atagttatgg aaaggaaatg 3060
taattatata agaccacaga tacaaaaaga tggccgtgc ttaacacgatc tgagtcatgg 3120
tcgtaccctt ttgcacactt ttcaagttt cttcgatca aatgactaca ctttttaaaaa 3180
taatttgaca gatgattgtt gcatgcataat aatattcgca aatgcccata ttctaccctt 3240
aaccaaataa tggtaatgg atataaaata gttAACATAA aaaaaatattt ggaaattttg 3300
aaaaatagag agtaaattga tttttttaa aaagtttgaa ttgaagtggaa aaaatataata 3360
ataaaaaataa taaacctgtt gtttgcata tataatgtt tagctcaatg ttgagtaact 3420

7

tgaagtcttg aattacttta tatgttttc tcacagatta tattatccc gttctatccc 3480
aagaattggg ataatatattct ctatattcga ggcctcttc ttaagaagtc ggtgtataat 3540
cttaagccct tacttgacac aaggcctcta taaaaagcc caataataat ttttctttc 3600
aaagccccac acgtcaagag gagaaagaag tgcgtttgcg tttggattga aaacgtggcg 3660
ggcggttsga aactgaatct taaacccttc actcacattc atcttcacccg tcaaatctct 3720
gaaactgagc ttgcacgatg ttgggtttac gaagatctgc gacgaccttg ttgcacatca 3780
gccagtctct gcttcgtaat gttacggta gttatctgtct aacacttcag cgccacatctt 3840
gggttttacg attagggttt caatagatcg aatcgattca tctctcttgg tattagattt 3900
catcaaattc aaatctatcg tcacctaataa atctctctt cggtatgttag tatttccggg 3960
gttgtttcaa agtcgtctta ttgctctgtg attttggctt cttaccatt ttcaacagtg 4020
ctatgtagaa gaaagaacaa atctttgaaa tcgaaaggc taatgtatag ttcaatgtct 4080
acattatgag attgccatga tattatagtc aaacgattct cctaaagcgt ttacttttgt 4140
ggagcattct ttgttagttc tatgcaaata aagttctagg aatgataatt cttaaggaag 4200
catctcaaata gttggctagt tcttgcctca ggttaaaaca atgtttgca atttgctttt 4260
agttagaatt gttgacttgc tttagctttt gactaactct gtctctgtga agcaaagttt 4320
gatcaaaccctt attaccttat ttgattcttc tcttttagatt atacatcaat ttatgtatctt 4380
tccttgccta cagtttcatg ggtaacgagt cca 4413

<210> 4

<211> 4309

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Insert du
vecteur pBin19

<400> 4

tctagaacta gtggatcccc cgggctgcag tcgaattgtg atatattgtt agcaatctga 60
aaagaataag tggatataat aaacaaccgg cgaaaagtaca agttctaccc ttttttggca 120
tggAACCATG tttttagat ttactttgtt attcctgaat ctttcatttc ttgaattgtt 180
atttacattt ttatcaaaaa aaaagtacaa gttctaccaa agcacaggag ttAAACAAACT 240
tgtgtgtcaa atgctaattt aaagcctaattt cttatgattt ccctttctt cacgatataat 300
actgatattt atatgcaccc atttgggtgtt cattaacttc ccactctata catcagtatc 360

tcaaagtgcgataacaatat ccataagaag tggtatatttg tgaaaaaaaaaaaaaaaagg 420
ggtatactgg tataatacat accacggctc cgaattgcct caacaatttc taggagaaaa 480
tggacgtgtc tccttggttt tattttatcc ttaataacat actctatatt ttaaacactt 540
cgatgtctcg cttaaaatttc gaatgtgcct aaatttctct aatcataaaat cgtaaagaaaa 600
attcgtcgaa gccacaggga catgcattgg gcacgttagt acctttaaaa ccatcaaaaa 660
tatattaata gaaaaggaaa ctccctaaaaa gaacaattta ataaagtggta taaaaaaaga 720
taagaaggta ggcagaagaa aacgtatggc cgcgactcgt aacaagggac gtcccacca 780
ctgcggagac ggcgagacgc tgactgatcc ttctttttc ttccctaaa gaacgttgtt 840
tcgtgcttac aagggtcaaa accatatcca attgttctgc ctattattat ataactaaag 900
atcccccttt gtgctttgtc ttatattcgtg atatataatc taacttaaat tagttctaaa 960
atataatatgt cctacctatg ttctactga cctcagtccc tagtagcta tatggacata 1020
tgtgaaaatg acgccccaaa ttgaagagt tcctcttcct gcaactaact cttatcttac 1080
tcattgagct atgttaaata ttgaatgttg gcactctcgt ataaatatg ccagttgcac 1140
ctagataaaa aaacatgata gacatttagt ttaaaacttg aaatgttatt tgaactcttt 1200
ggattacgtg gattgttgta tggattaaat ttgaagata ttatataattt gaagatgttt 1260
atataatatta gagtttataat agcagaaaaat attgatgttag atgttgcct ttgttagtt 1320
ctcttttttgc ttgcgtagtc ctcccttcctc atccctctat gaagaaaaat ccaaatagtt 1380
taaggaaatt ttgtgttaat tcatagtctt ttgcgtacc acagttctat gtagctatcg 1440
tcatacatatt cctcttgca acaacaaaaa agatcgttt tgtaaaattt agtagggcac 1500
taaagtgcgc tttgttgta ctgtcgaaat ctgcgttct gtcatccaca aataagttgt 1560
ttgattcgtg cttccaaagat tataatcttt tttagatggg tcatacgat ttctaaacttc 1620
gtatacgagt gtatccatat aatttctaac atatacgct tgggttgggt aggctctgcg 1680
tctttgaga ccacccctt gctaattttt tggtgcacct tagacaatcc ataatacggt 1740
acgtgagtcg aagttgcacc aaaatggtcc aaatataatt taaatttggc cacaaaaacaa 1800
catttacaa acaaattcaa caaacatgca tcgtttcaaa ttatatttata tcaatggcgt 1860
tatttggta tttgtaaat tctgtttaaac tcactgacga attttttat ttttcaaaga 1920
agaacatttt tgatataaaat aacattttat ggaaccacccg gttaagctcg atgattttga 1980
gttttagttt tggttttttg tgaaatcatt aacgcacccctc atttgcatttt tcattacttt 2040
aataattagg aatcaaacat gatgattaag ttccaccaag acgtctctta tggctattaa 2100
gagtcagacg caaggatgac cggggtcatt aagacgtctt atattcaacc attactccac 2160
taattgctaa ttaatcgatc ccttatgtt cgtcctgttag aaaccccaac ccgtgaaatc 2220
aaaaaaactcg acggcctgtg ggcattcagt ctggatcgcg aaaactgtgg aattgatcag 2280
cggtggggaaagcggtt acaagaaagc cgggcaatttgcgtgccagg cagtttaac 2340
gatcagttcg ccgtatcgatc tattcgtaat tatgcgggca acgtctggta tcagcgcgaa 2400
gtcttatac cgaaagggtt ggcaggccag cgtatcgatc tgcgtttcga tgcgggtcact 2460

9

cattacggca aagtgtgggt caataatcg gaagtgtatgg agcatcaggg cggctatacg 2520
ccatttgaag ccgatgtcac gccgtatgtt attgccggga aaagtgtacg ttcaccgtt 2580
tgtgtgaaca acgaactgaa ctggcagact atcccgcgg gaatgggtat taccgacgaa 2640
aacggcaaga aaaaggcagtc ttacttccat gatttctta actatgccgg aatccatcgc 2700
agcgtaatgc tctacaccac gccgaacacc tgggtggacg atatcaccgt ggtgacgcat 2760
gtcgcgcaag actgtAACCA cgcgctgtt gactggcagg tgggtggccaa tggtgatgtc 2820
agcgTTGAAC tgcgtgatgc ggatcaacag gtgggtgcaa ctggacaagg cactagcggg 2880
actttgcaag tggtaatcc gcacctctgg caaccgggtg aaggttatct ctatgaactg 2940
tgcgtcacag ccaaaAGCCA gacagagtgt gatatctacc cgcttcgcgt cggcatccgg 3000
tcagtgccag tgaaggGCCA acagttcctg attaaccaca aaccgttcta ctttactggc 3060
tttggtcgTC atgaagatgc ggacttacgt ggcAAaggat tcgataacgt gctgatggtg 3120
cacgaccacg cattaatgga ctggattggg gccaactcct accgtacctc gcattaccct 3180
tacgctgaag agatgctcga ctgggcagat gaacatggca tcgtggtgat tgatgaaaact 3240
gctgctgtcg gctttaacct ctcttaggc attggttcg aagcgggcaa caagccgaaa 3300
gaactgtaca gcgaagaggc agtcaacggg gaaactcagc aagcgcactt acaggcgatt 3360
aaagagctga tagcgcgtga caaaaaccac ccaagcgtgg tgatgtggag tattGCCAAC 3420
gaaccggata cccgtccgca agtgcacggg aataattcgc cactggcgga agcaacgcgt 3480
aaactcgacc cgacgcgtcc gatcacctgc gtcaatgtaa tttctgcga cgctcacacc 3540
gataccatca gcgatcttt tgatgtgctg tgcctgaacc gttattacgg atggtatgtc 3600
caaagcggcg atttggaaac ggcagagaag gtactggaaa aagaacttct ggcttggcag 3660
gagaaaactgc atcagccgat tatacatcacc gaatacggcg tggatacgtt agccgggctg 3720
cactcaatgt acaccgacat. gtggagtgaa gagtatacgt gtgcacggctt ggatatgtat 3780
caccgcgtct ttgatcgcgt cagcgcgtc gtcggtaac aggtatggaa tttcgccgat 3840
tttgcgacct cgcaaggcat attgcgcgtt ggccgttaaca agaaaggat cttcactcgc 3900
gaccgcaaac cgaagtcggc ggctttctg ctgcaaaaac gctggactgg catgaacttc 3960
ggtgaaaaac cgcagcaggg aggcaaaacaa tgaatcaaca actctcctgg cgcaccatcg 4020
tcggctacag cctcggtggg gaattgagct cgatcgatca aacatttggc aataaaagttt 4080
cttaagattt aatcctgttg ccggcttgc gatgattatc atataatttc ttttgatgtt 4140
cgttaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat gggttttat 4200
gattagagtc cgcattat acatttaata cgcgtatgaa aacaaaatat agcgcgcaaa 4260
ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtcattc tatgttacta gatcgaatt 4309

<210> 5

<211> 7599

10

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: ADN-T de PGKB5

<400> 5

ggaaacagct atgaccatga ttacgccaag ctcggaaatta accctcacta aaggaaacaa 60
aagctggagc tccaccgcgg tggcgccgc tctagaggat ccccccacag acagctccgt 120
agccctcggt ctcccttggag ttcttcggga aatggatctt tcgatccccg atgatgtctc 180
tcttatctgc tttgacgacg ccgactggac atccgctata acgcccgcatt tgaccgtgat 240
ttcgcaacct gtcagggatc tcgcgacggc tgccacagaa gacctgatcg cccgcttaaa 300
ggcgagact tcagccccac ccaaggaaac tcttctcccg gcggttctca tagagcgccg 360
ttccgttaagc ggttcttcgc aaggtcgggg ttgcataccg aactcgcgaa acgtcgccga 420
ctgagctccc gaggcgcgtt gacaagatgc cacgaaggaa atgaaagaca gccgatattg 480
caattgtctt cgtggactgc tttcgggacg taaggcgcaa gccatcatca ccggccgtcct 540
aaacaaacat acctccacac aaatttatct acctgaccac aagatataatc ctgtcacacg 600
atttattaaa cgctgcactt ggggtggtca gtcccttatg ttacgtcctg tagaaacccc 660
aacccgtgaa atcaaaaaac tcgacggcct gtgggcattc agtctggatc gcgaaaactg 720
tggaaattgat cagcggttgtt gggaaagcgc gttacaagaa agccgggcaa ttgctgtgcc 780
aggcagttt aacgatcagt tcgcccgtatgc agatattcgt aattatgcgg gcaacgtctg 840
gtatcagcgc gaagtcttta taccgaaagg ttgggcaggc cagcgtatcg tgctcggtt 900
cgatcggttc actcattacg gcaaagtgtg ggtcaataat caggaagtga tggagcatca 960
gggcggctat acgccatttg aagccgtatgt cacgcccgtat gttattgccc ggaaaagtgt 1020
acgtatcacc gtttgtgtga acaacgaact gaactggcag actatcccgc cggaaatgg 1080
gattaccgac gaaaacggca agaaaaagca gtcttacttc catgatttct ttaactatgc 1140
cggaatccat cgcagcgtaa tgctctacac cacgcccgaac acctgggtgg acgatatcac 1200
cgtgggtgacg catgtcgccgc aagactgtaa ccacgcgtct gttgactggc aggtgggtggc 1260
caatggtgat gtcagcggtt aactgcgtga tgccggatcaa caggtgggttgc caactggaca 1320
aggcacttagc gggactttgc aagtggtgaa tccgcaccctc tggcaaccgg gtgaagggtta 1380
tctctatgaa ctgtgcgtca cagccaaaag ccagacagag tgtgatatct acccgcttcg 1440
cgtcgccatc cggtcagtgg cagtgaaggg ccaacagttc ctgattaacc acaaaccgtt 1500
ctactttact ggcttggtc gtcatgaaga tgcggactta cgtggcaaag gattcgataa 1560
cgtgctgatg gtgcacgacc acgcattaat ggactggatt gggccaaact cctaccgtac 1620

11

ctcgcatattac ctttacgctg aagagatgct cgactggca gatgaacatg gcatacggtt 1680
gatttatgaa actgctgctg tcggcttaa cctctcttttta ggcattgggt tcgaagcggg 1740
caacaagccg aaagaactgt acagcgaaga ggcagtcaac gggaaaactc agcaagcgca 1800
cttacaggcg attaaagagc tgatagcgcg tgacaaaaac cacccaagcg tggtgatgtg 1860
gagtattgcc aacgaaccgg ataccgtcc gcaagtgcac gggaatattt cgccactggc 1920
ggaagcaacg cgtaaaactcg acccgacgacg tccgatcacc tgcgtcaatg taatgttctg 1980
cgacgctcac accgataccca tcagcgatct ctgtatgtg ctgtgcctga accgttatta 2040
cgatggtat gtccaaagcg gcgatggaa aacggcagag aaggtactgg aaaaagaact 2100
tctggctgg caggagaaaac tgcattcagcc gattatcatc accgaatacg gcgtggatac 2160
gttagccggg ctgcactcaa tgtacaccga catgtggagt gaagagtatc agtgtgcattg 2220
gctggatatg tatcaccgcg tcttgatcg cgtcagcgcc gtcgtcggtt aacaggtatg 2280
gaatttcgcc gattttgcga cctcgcaagg catattgcgc gttggcggta acaagaaagg 2340
gatcttcaact cgcgaccgca aaccgaagtc ggccggctttt ctgctgcaaa aacgctggac 2400
tggcatgaac ttccggtaaaa aaccgcagca gggaggcaaa caatgaatca acaactctcc 2460
tggcgcacca tcgtcggcta cagcctcggt ggggaattga gctcgatcg tcaaacattt 2520
ggcaataaaag ttcttaaga ttgaatcctg ttgccggctc tgcgtatgatt atcatataat 2580
ttctgttggaa ttacgttaag catgtataaa ttaacatgtt atgcgtatgacg ttatttatga 2640
gatgggtttt tatgatttataa gtcccccaat tatacatttta atacgcgata gaaaacaaaa 2700
tatagcgcgc aaacttaggt aaattatcgc ggcgggtgtc atctatgttta ctagatcgaa 2760
ttcgatcgag gggatcgagc ccctgctgag cctcgacatg ttgtcgcaaa attcgccctg 2820
gacccgccccca acgatttgcg gtcactgtca aggtttgacc tgcacttcat ttggggccccca 2880
catacaccaa aaaaatgtcg cataattctc ggggcagcaa gtcggttacc cggccgcgt 2940
gctggaccgg gttgaatggc gcccgttaact ttccggtagag cggacggcca atactcaact 3000
tcaaggaatc tcacccatgc ggcggggcg ggaaccggag ttcccttcag tgaacgttat 3060
tagttcgccg ctccgtgtgt cgtagataact agccccctggg gccttttta atttgaataa 3120
gatttatgtt atcagtctt tagtttgac cggttctgcc gctttttta aaattggatt 3180
tgtaataataa aaacgcattt gtttggatt gtggcgctct atcatagatg tgcgtataaaa 3240
cctattcagc acaatatattt gtttcatattt taatattgtt catataagta gtagggtaca 3300
atcagtaaat tgaacggaga atattattca taaaaatacg atagtaacgg gtqatatatt 3360
cattagaatg aaccgaaacc ggcggtaagg atctgagctca cacatgctca ggtttttac 3420
aacgtgcaca acagaattga aagcaaataat catgcgtatca taggcgtctc gcataatctca 3480
ttaaaggcagg ggggtggcgca agaactccag catgagatcc cccgcgtggta ggtatccca 3540
gccggcgtcc cggaaaaacga ttccgaagcc caaccttca tagaaggcgg cgggtgaaatc 3600
gaaatctcgatgtt gatggcaggt tggcgatcg tggcgatgtc atttcgaacc ccagagtccc 3660
gctcagaaga actcgtaag aaggcgatag aaggcgatgc gctcgaaatc gggagcggcg 3720

12

ataccgtaaa gcacgaggaa gcggtcagcc cattcgccgc caagctttc agcaatatca 3780
cgggtagcca acgctatgtc ctgatagcg tccgccacac ccagccggcc acagtcgatg 3840
aatccagaaa agcggccatt ttccaccatg atattcggca agcaggcatc gccatggtc 3900
acgacgagat cctcgccgtc gggcatgcgc gccttgagcc tggcgaacag ttccggctggc 3960
gogagccccct gatgcttttc gtccagatca tcctgatcga caagaccggc ttccatccga 4020
gtacgtgctc gctcgatgct atgtttcgct tggtggtcga atgggcaggt agccggatca 4080
agcgtatgca gccgcccgt cat tgcatcagcc atgatggata ctttctcggc aggagcaagg 4140
tgagatgaca ggagatcctg ccccggact tcgccccata gcagccagtc cttcccgct 4200
tcagtgacaa cgtcgagcac agctcgccaa ggaacgccccg tcgtggccag ccacgatagc 4260
cgcgctgcct cgtcctgcag ttcattcagg gcaccggaca ggtcggctt gacaaaaaga 4320
accggggcgc cctgcgctga cagccggaac acggccggcat cagagcagcc gattgtctgt 4380
tgtgcccagt catagccgaa tagcctctcc acccaagcgg ccggagaacc tgcgtgcaat 4440
ccatcttgtt caatccacat gatcatggc cggatcttg attgagagtg aatatgagac 4500
tctaattgga taccgagggg aatttatgga acgtcagtgg agcattttt acaagaaata 4560
tttgcttagt gatagtgacc tttaggcact tttgaacgcg caataatggt ttctgacgta 4620
tgtgcttagc tcataaaact ccagaaaccc gcccgtgagt ggctccttca atcggtgcgg 4680
ttctgtcagt tccaaacgta aaacggcttgc tcccgctca tcggcggggg tcataacgtg 4740
actcccttaa ttctccgctc atgatcctgt ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcaca 4800
ttccacacat tatacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctggggtgcc taatgagtga 4860
gctaactcac attaattgcg ttgcgcac tgccgcctt ccagtcggga aacctgtcgt 4920
gccagctgca ttaatgaatc ggaattgacg gatctcctt gccccggaga tcaccatgga 4980
cgactttctc tatctctacg atcttaggaag aaagttcgac ggagaaggtg acgataaccat 5040
gttcaccacc gataatgaga agattgcct cttcaatttc agaaagaatg ctgacccaca 5100
gatggttaga gaggcctacg cggcaggtct catcaagacg atctacccga gtaataatct 5160
ccaggagatc aaataaccttc ccaagaaggt taaagatgca gtcaaaagat tcaggactaa 5220
ctgcatcaag aacacagaga aagatataatt tctcaagatc agaagtacta ttccagttatg 5280
gacgattcaa ggcttgcttc ataaaccaag gcaagtaata gagattggag tctctaagaa 5340
agtagttcct actgaatcaa aggccatgga gtcaaaaatt cagatcgagg atctaacaga 5400
actcgccgtg aagactggcg aacagttcat acagagtctt ttacgactca atgacaagaa 5460
gaaaatcttc gtcaacatgg tggagcacga cactctcgtc tactccaaga atatcaaaga 5520
tacagtctca gaagaccaaa gggctattga gactttcaa caaagggtaa tatcgggaaa 5580
cctcctcgga ttccattgcc cagctatctg tcacttcatc aaaaggacag tagaaaagga 5640
agggtggcacc tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gctatcggtc aagatgcctc 5700
tgccgacagt ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtgg aaaaagaaga 5760
cggttccaaacc acgtcttcaa agcaagtggta ttgatgtgat atctccactg acgttaaggg 5820

13

tgacgcacaa tcccactatac cttcgcaaga cccttcctct atataaggaa gttcatttca 5880
tttggagagg acacgctgaa atcaccagtc tctctctaca aatcgatcc atgagccag 5940
aacgacgccc ggccgacatc cgccgtgcc a cccggcgga catgccggcg gtctgcacca 6000
tcgtcaacca ctacatcgag acaagcacgg tcaacttccg taccgagccg caggaaccgc 6060
aggagtgac ggacgacctc gtccgtctgc gggagcgcta tccctggctc gtcgcccagg 6120
tggacggcga ggtcgccggc atcgctacg cggggccccctg gaaggcacgc aacgcctacg 6180
actggacggc cgagtcgacc gtgtacgtct ccccccggca ccagcggacg ggactgggct 6240
ccacgctcta caccacacctg ctgaagtccc tggaggcaca gggcttcaag agcgtggctg 6300
ctgtcatcg ggctgccaac gacccgagcg tgccatgca cgaggcgctc ggatatgccc 6360
cccgccggcat gctgccccggc gccggcttca agcacgggaa ctggcatgac gtgggtttct 6420
ggcagctgga cttcagcctg ccggtaaccgc cccgtccggc cctgcccgtc accgagatct 6480
gatctcacgc gtctaggatc cgatggatcc cccgatgagc taagcttagct atatcatcaa 6540
tttatgtatt acacataata tcgcactcag tctttcatct acggcaatgt accagctgat 6600
ataatcagtt attgaaatat ttctgaattt aaacttgcac caataaaattt atgtttttgc 6660
ttggactata atacctgact tggattttta tcaataaaata tttaaactat atttctttca 6720
agatggaat taacatctac aaattgcctt ttcttatcga ccatgtacat caagcttatac 6780
gataccgtcg gctattggta ataggacact gggattcgct ttggacaact ttccctctca 6840
tctaagcgta gacaaccctc aactggaaac gggccggact ccagggcgtg tgccaggtgc 6900
ccacggaata gtttggcca gacccttggaa aatccgattc agtacaatcg attgcccctca 6960
ttttacgtt ggcataatatac ctgccaaaca gccaaacaacg cgcgtgcgggta gaataggaaa 7020
gcgtttgagt tgcttgctca tatcgatcag gttgacagca caggttgacc gcttgatgat 7080
tcgtacgagc cgccaaacat tggctgtcgat aatgatatac catgtcagaa cagcaatccg 7140
atggggcgga aagcattatac ttaatgcaca cggaaatggc gcgtcggtgg gtggaaataca 7200
ccgacataga ggccgttaagt tctgcatggt catcgatcgga aaggtggcag cagggcgcacg 7260
gcgtgtggcct cttgtctttt cagcgatggaa tgcgtgttga aagaataatcg gaagagagcg 7320
tccgctcgac accttcaatt atgcccattt gatcgatgaa ctgatcgagc tctgaaatcg 7380
aaggggcttc gataatcgca atcaaataa aagtgcact cacagaatga agagcgataa 7440
cgccgtgac cttcccaagg gaggccgtca cctgtgaaag cgccttcgtt atgggtatca 7500
gaatatgggc tcgaacccaag ctcgagaccc ctgggggggg cccggtaacc aattcgccct 7560
atagtgagtc gtattacaat tcactggccg tcgttttac 7599

<210> 6

<211> 31

<212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

14

<400> 6

ggcaagcttg taatacgact cactataggg c

31

<210> 7

<211> 25

<212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 7

ctaggatcc agccattccc tatgc

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: al Application No
PCT/FR 00/01768

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7	C12N15/29	C12N15/82	A01H5/00
-------	-----------	-----------	----------

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: B26447, 13 October 1997 (1997-10-13) ROUNSLEY, D., ET AL.: "F2K20TF IGF Arabidopsis thaliana genomic clone F2K20." XP002133167 the whole document --- DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AB025605, 9 April 1999 (1999-04-09) NAKAMURA, Y.: "Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, BAC clone:F5H8." XP002151497 nts 16471-16549 --- -/-/	1,2
X		1,2

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

31 October 2000

10/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01768

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AC012193, 22 October 1999 (1999-10-22) LIN, X., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome I BAC T32E8 genomic sequence, complete sequence." XP002151480 nts 40302-42450 ---	1,2
A	WO 94 02619 A (PIONEER HI BRED INT) 3 February 1994 (1994-02-03) the whole document ---	1,4,6,8, 11-13, 15-21, 23-25
A	WO 90 07001 A (DU PONT) 28 June 1990 (1990-06-28) page 41, line 20 - line 25 ---	6
A	DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NO: AC007289, 13 April 1999 (1999-04-13) LIN, X., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome II BAC F16J10 genomic sequence, complete sequence." XP002133166 nts 34515-34630 ---	1,2
A	WO 91 13992 A (CAMBRIDGE ADVANCED TECH ;RHONE POULENC LTD (GB); TWYFORD SEEDS LTD) 19 September 1991 (1991-09-19) the whole document ---	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25
A	EP 0 824 150 A (SUMITOMO CHEMICAL CO) 18 February 1998 (1998-02-18) the whole document ---	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25
A	US 5 110 732 A (BENFEY PHILIP N ET AL) 5 May 1992 (1992-05-05) the whole document ---	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25
A	US 5 837 848 A (EVANS IAN JEFFREY ET AL) 17 November 1998 (1998-11-17) the whole document ---	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: ai Application No

PCT/FR 00/01768

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	XIANG CHENGBIN ET AL: "DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in <i>Arabidopsis thaliana</i> ." PLANT MOLECULAR BIOLOGY 1997, vol. 34, no. 3, 1997, pages 403-415, XP002133168 ISSN: 0167-4412 the whole document ---	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25
A	VAN DE RHEE MIRANDA D ET AL: "Analysis of regulatory elements involved in stress-induced and organ-specific expression of tobacco acidic and basic beta-1, 3-glucanase genes." PLANT MOLECULAR BIOLOGY 1993, vol. 21, no. 3, 1993, pages 451-461, XP002133169 ISSN: 0167-4412 the whole document ---	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25
A	WEI TAO ET AL: "Structure and characterization of a putative drought-inducible H1 histone gene." PLANT MOLECULAR BIOLOGY 1996, vol. 30, no. 2, 1996, pages 255-268, XP002133170 ISSN: 0167-4412 the whole document ---	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25
A	SUZUKI H ET AL: "Deletion analysis and localization of SbPRP1, a soybean cell wall protein gene, in roots of transgenic tobacco and cowpea." PLANT MOLECULAR BIOLOGY 1993, vol. 21, no. 1, 1993, pages 109-119, XP002133171 ISSN: 0167-4412 the whole document ---	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No
PCT/FR 00/01768

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; June 1999 (1999-06) KAMO K ET AL: "Tissue specificity and expression level of gusA under r01D, mannopine synthase and translation elongation factor 1 subunit alpha promoters in transgenic Gladiolus plants." Database accession no. PREV199900386225 XP002133172 abstract & PLANT CELL REPORTS JUNE, 1999, vol. 18, no. 10, June 1999 (1999-06), pages 809-815, ISSN: 0721-7714</p> <p>---</p>	1, 4, 8, 11-13, 15-21, 23-25
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 23 November 1998 (1998-11-23) OKRESZ LASZLO ET AL: "T-DNA trapping of a cryptic promoter identifies an ortholog of highly conserved SNZ growth arrest response genes in Arabidopsis." Database accession no. PREV199900048625 XP002133173 abstract & PLANT SCIENCE (SHANNON) NOV. 23, 1998, vol. 138, no. 2, 23 November 1998 (1998-11-23), pages 217-228, ISSN: 0168-9452</p> <p>---</p>	1, 4, 8, 11-13, 15-21, 23-25
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; April 1999 (1999-04) MARTIRANI LUCA ET AL: "T-DNA tagging of nodulation- and root-related genes in Lotus japonicus: Expression patterns and potential for promoter trapping and insertional mutagenesis." Database accession no. PREV199900213703 XP002133174 abstract & MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS APRIL, 1999, vol. 12, no. 4, April 1999 (1999-04), pages 275-284, ISSN: 0894-0282</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: ai Application No
PCT/FR 00/01768

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LINDSEY K ET AL: "TAGGING GENOMIC SEQUENCES THAT DIRECT TRANSGENE EXPRESSION BY ACTIVATION OF A PROMOTER TRAP IN PLANTS" TRANSGENIC RESEARCH, GB, LONDON, vol. 2, no. 1, 1993, pages 33-47, XP002000606 ISSN: 0962-8819 the whole document -----	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat'l Application No

PCT/FR 00/01768

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9402619	A	03-02-1994	US 5401836 A AT 166108 T AU 672618 B AU 4673893 A BR 9306737 A CA 2140014 A DE 69318558 D DE 69318558 T EP 0651813 A JP 8501923 T MX 9304285 A NZ 254577 A	28-03-1995 15-05-1998 10-10-1996 14-02-1994 08-12-1998 03-02-1994 18-06-1998 10-09-1998 10-05-1995 05-03-1996 29-07-1994 25-06-1996
WO 9007001	A	28-06-1990	AU 4828490 A	10-07-1990
WO 9113992	A	19-09-1991	CA 2078327 A EP 0521910 A JP 7501683 T	17-09-1991 13-01-1993 23-02-1995
EP 0824150	A	18-02-1998	JP 10052273 A CA 2212592 A US 5959176 A	24-02-1998 12-02-1998 28-09-1999
US 5110732	A	05-05-1992	AU 641380 B AU 5120790 A	23-09-1993 20-09-1990
US 5837848	A	17-11-1998	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N°

PCT/FR 00/01768

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N15/29 C12N15/82 A01H5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12N A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: B26447, 13 octobre 1997 (1997-10-13) ROUNSLEY, D., ET AL.: "F2K20TF IGF Arabidopsis thaliana genomic clone F2K20." XP002133167 1e document en entier ---	1,2
X	DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AB025605, 9 avril 1999 (1999-04-09) NAKAMURA, Y.: "Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, BAC clone:F5H8." XP002151497 nts 16471-16549 --- -/-	1,2

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

31 octobre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10/11/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Maddox, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 00/01768

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AC012193, 22 octobre 1999 (1999-10-22) LIN. X., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome I BAC T32E8 genomic sequence, complete sequence." XP002151480 nts 40302-42450 ---	1,2
A	WO 94 02619 A (PIONEER HI BRED INT) 3 février 1994 (1994-02-03) le document en entier ---	1,4,6,8, 11-13, 15-21, 23-25
A	WO 90 07001 A (DU PONT) 28 juin 1990 (1990-06-28) page 41, ligne 20 - ligne 25 ---	6
A	DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AC007289, 13 avril 1999 (1999-04-13) LIN. X., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome II BAC F16J10 genomic sequence, complete sequence." XP002133166 nts 34515-34630 ---	1,2
A	WO 91 13992 A (CAMBRIDGE ADVANCED TECH ;RHONE POULENC LTD (GB); TWYFORD SEEDS LTD) 19 septembre 1991 (1991-09-19) le document en entier ---	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25
A	EP 0 824 150 A (SUMITOMO CHEMICAL CO) 18 février 1998 (1998-02-18) le document en entier ---	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25
A	US 5 110 732 A (BENFEY PHILIP N ET AL) 5 mai 1992 (1992-05-05) le document en entier ---	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25
A	US 5 837 848 A (EVANS IAN JEFFREY ET AL) 17 novembre 1998 (1998-11-17) le document en entier ---	1,4,8, 11-13, 15-21, 23-25
		-/-

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 00/01768

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	XIANG CHENGBIN ET AL: "DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in <i>Arabidopsis thaliana</i> ." PLANT MOLECULAR BIOLOGY 1997, vol. 34, no. 3, 1997, pages 403-415, XP002133168 ISSN: 0167-4412 le document en entier ---	1, 4, 8, 11-13, 15-21, 23-25
A	VAN DE RHEE MIRANDA D ET AL: "Analysis of regulatory elements involved in stress-induced and organ-specific expression of tobacco acidic and basic beta-1, 3-glucanase genes." PLANT MOLECULAR BIOLOGY 1993, vol. 21, no. 3, 1993, pages 451-461, XP002133169 ISSN: 0167-4412 le document en entier ---	1, 4, 8, 11-13, 15-21, 23-25
A	WEI TAO ET AL: "Structure and characterization of a putative drought-inducible H1 histone gene." PLANT MOLECULAR BIOLOGY 1996, vol. 30, no. 2, 1996, pages 255-268, XP002133170 ISSN: 0167-4412 le document en entier ---	1, 4, 8, 11-13, 15-21, 23-25
A	SUZUKI H ET AL: "Deletion analysis and localization of SbPRP1, a soybean cell wall protein gene, in roots of transgenic tobacco and cowpea." PLANT MOLECULAR BIOLOGY 1993, vol. 21, no. 1, 1993, pages 109-119, XP002133171 ISSN: 0167-4412 le document en entier ---	1, 4, 8, 11-13, 15-21, 23-25
		-/-

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demand	Internationale No
PCT/FR 00/01768	

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DATABASE BIOSIS 'en ligne! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; juin 1999 (1999-06) KAMO K ET AL: "Tissue specificity and expression level of gusA under r01D, mannopine synthase and translation elongation factor 1 subunit alpha promoters in transgenic Gladiolus plants." Database accession no. PREV199900386225 XP002133172 abrégé & PLANT CELL REPORTS JUNE, 1999, vol. 18, no. 10, juin 1999 (1999-06), pages 809-815, ISSN: 0721-7714 ---</p>	1, 4, 8, 11-13, 15-21, 23-25
A	<p>DATABASE BIOSIS 'en ligne! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 23 novembre 1998 (1998-11-23) OKRESZ LASZLO ET AL: "T-DNA trapping of a cryptic promoter identifies and ortholog of highly conserved SNZ growth arrest response genes in Arabidopsis." Database accession no. PREV199900048625 XP002133173 abrégé & PLANT SCIENCE (SHANNON) NOV. 23, 1998, vol. 138, no. 2, 23 novembre 1998 (1998-11-23), pages 217-228, ISSN: 0168-9452 ---</p>	1, 4, 8, 11-13, 15-21, 23-25
A	<p>DATABASE BIOSIS 'en ligne! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; avril 1999 (1999-04) MARTIRANI LUCA ET AL: "T-DNA tagging of nodulation- and root-related genes in Lotus japonicus: Expression patterns and potential for promoter trapping and insertional mutagenesis." Database accession no. PREV199900213703 XP002133174 abrégé & MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS APRIL, 1999, vol. 12, no. 4, avril 1999 (1999-04), pages 275-284, ISSN: 0894-0282 ---</p>	1-25
		-/-

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar Internationale No
PCT/FR 00/01768

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	LINDSEY K ET AL: "TAGGING GENOMIC SEQUENCES THAT DIRECT TRANSGENE EXPRESSION BY ACTIVATION OF A PROMOTER TRAP IN PLANTS" TRANSGENIC RESEARCH, GB, LONDON, vol. 2, no. 1, 1993, pages 33-47, XP002000606 ISSN: 0962-8819 le document en entier -----	1-25